

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio sobre interacciones de catecolaminas cerebrales,
hormonas adrenocorticales y ácido ascórbico en situaciones
de "stress"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Ángeles Torrellas Galán

DIRECTOR:

Sara Borrell Ruiz

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310046258

T 577.175
TOR
est

ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES
DE CATECOLAMINAS CEREBRALES, HORMONAS ADRENOCORTICALES
Y ACIDO ASCORBICO EN SITUACIONES DE "STRESS."

TESIS

que para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

presenta

Angeles Torrellas Galán



R. 28.327

Madrid, 1978

Mi agradecimiento a la Dra.Sara Borrell Ruiz, Profesor de Investigación y Jefe de la Sección de Esteroides del Instituto de Endocrinología y Metabolismo "G.Marañón" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la dirección y orientación en la realización de este trabajo y al Prof.Dr.Arsenio Fraile Ovejero, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid por su amabilidad al revisar esta Tesis y ser Ponente de la misma.

Igualmente quiero dar las gracias a todos mis compañeros que con su ayuda y colaboración han hecho posible la realización de este trabajo.

INDICE

Páginas

INTRODUCCION

Consideraciones generales	2
Planteamiento del trabajo	25

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación	31
Determinación de catecolaminas en glándula adrenal	35
Determinación de dopamina y noradrenalina en cerebro	38
Determinación de corticosteroides en glándula adrenal y plasma.....	42
Determinación de ácido ascórbico en glándula adrenal	47
Método estadístico	50
Instrumentación	52

RESULTADOS

Animales intactos y control	55
Animales control sometidos a inmovilización	64
Administración de fenobarbital y respuesta a la inmovilización	69

	<u>Páginas</u>
Administración de difenilhidantoína y respuesta a la inmovilización	75
Administración compuesta de feno- barbital y difenilhidantoína y res- puesta a la inmovilización	83
Figuras correspondientes a los distintos tratamientos	91
Tablas correspondientes a los resultados individuales	105
<i>DISCUSION</i>	142
<i>CONCLUSIONES</i>	183
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	187

I N T R O D U C C I O N

La adaptación del organismo animal al cambio dinámico del medio ambiente requiere una cadena de respuestas endocrinas y metabólicas con el fin de preservar la "homeostasis" del medio interno. La organización de esta serie de respuestas adaptativas está asegurada además de por los mecanismos de integración del sistema nervioso, por los sistemas hormonales que intervienen muy directamente en el desarrollo de los procesos adaptativos.

La idea de una regulación de estabilidad del medio interno desarrollada principalmente por Claude Bernard, se extendió después con los estudios de Cannon (1914) quién destacó la importancia del sistema nervioso simpático-adrenomedular en los mecanismos de defensa del organismo y más tarde con los de Selye (1936) en que se asocia la adaptación a situaciones de "stress" con una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal; desde entonces se viene investigando el papel que las catecolaminas del cerebro y médula adrenal y las hormonas adrenocorticales pueden tener en los diferentes procesos de adaptación y defensa del organismo animal.

Desde hace tiempo, se ha venido investigando el papel del sistema nervioso central, y particularmente del hipotálamo, en el control de la síntesis y liberación de las hormonas de la hipófisis anterior; se ha postulado que esta estructura, de gran importancia en los procesos de integración neuroendocrina, contiene neuronas secretoras de los denominados factores de liberación de las correspondientes hormonas hipofisarias, sugiriéndose que en virtud de estímulos externos e internos que llegan al hipotálamo se produce la liberación de un posible factor de liberación de hormona adrenocorticotropa en el plexo capilar primario de la eminencia media, el cual es transportado por el sistema porta-hipotálamo-hipofisario a la hipófisis anterior donde actúa directa y específicamente modulando la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual induce posteriormente en la glándula adrenal la síntesis y liberación de los corticosteroides.

El hecho de que mediante técnicas farmacológicas, y de fluorescencia histoquímica (Carlsson y col., 1962; Anden y col., 1964; Fuxe y Hökfelt, 1969) se haya podido demostrar la existencia de una extensa distribución de monoaminas en la región hipotalámica, ha conducido a muchos investigadores

a considerar la hipótesis de que el nexo de unión entre el sistema nervioso y el endocrino pudiera ser, al menos en parte, de tipo adrenérgico y al ser las catecolaminas dopamina y noradrenalina los mediadores químicos implicados en la mayoría de estas sinapsis, se viene considerando que estas bioaminas pueden jugar un importante papel en la regulación de la secreción del factor de liberación de ACTH (Battacharya y Marks, 1969; Ganong, 1970; Scapagnini y col., 1970; Van Loon y col., 1971a,b). Además de la implicación adrenérgica, no se descarta la posible participación también de mecanismos colinérgicos (Hedge y Smelik, 1968) y serotoninérgicos (Vernikos-Danellis y col., 1973) en el control de la secreción de ACTH bajo diferentes situaciones experimentales.

Son conocidas las fluctuaciones rítmicas que presentan los niveles de hormonas adrenocorticales tanto en el hombre como en animales de experimentación, que se traducen en la existencia de un ritmo circadiano de estas hormonas, que implica la presencia de un máximo y un mínimo de actividad en un período aproximado de 24 horas (Halberg y col., 1959; Critchlow y col., 1963; Krieger y Krieger, 1966).

Aún cuando con ligeras modificaciones en las condiciones experimentales de los distintos laboratorios, está aceptado un modelo en la secreción de corticosterona en la rata, con un máximo por la tarde, aproximadamente una hora antes del comienzo del período de oscuridad y un mínimo por la mañana una hora antes del inicio del período de luz.

Pero no sólo existen variaciones a lo largo de un período de 24 horas en los niveles de hormonas adrenocorticales, sino que se ha demostrado en la rata (Retiene, 1970) que la concentración hipofisaria de ACTH, que estimula la síntesis y liberación de los corticosteroides, presenta fluctuaciones rítmicas postulándose que los aumentos y descensos que se observan en los niveles de ACTH, preceden a los cambios similares descritos para las hormonas adrenocorticales.

Ya que la secreción de ACTH se piensa está bajo el control de un posible factor de liberación de hormona adrenocorticotropa (CRF), se ha postulado hace tiempo que posiblemente la actividad de esta hormona hipotalámica estuviese sometida también a unos cambios rítmicos. En esta línea, Hiroshige (1973) consiguió demostrar variaciones en el con-

tenido de CRF en el hipotálamo de la rata, indicando valores bajos por la mañana, aumentando después gradualmente hasta alcanzar niveles máximos por la tarde; estos autores establecen la posibilidad de que las fluctuaciones rítmicas en la actividad del CRF observados en la eminencia media del hipotálamo de la rata, induzcan las variaciones en la secreción de ACTH circulante causando posteriormente los cambios de tipo circadiano que presentan los niveles de corticosterona circulante y en glándula adrenal.

Por otro lado, algunos estudios indican variaciones rítmicas a lo largo del día en los niveles de dopamina, noradrenalina y serotonina en cerebro total (Scheving y col., 1968a) o en áreas discretas del mismo (Simon y George, 1975), sugiriéndose la existencia de un ritmo de tipo ultradiano, es decir que presenta más de un máximo y un mínimo durante las 24 horas del día, en los niveles de estas bioaminas en el cerebro de la rata.

También hemos de destacar que la proximidad anatómica entre el tejido cortical y el medular en la glándula adrenal de la rata, ha hecho sugerir hace tiempo la existencia de una posible interrelación entre los productos de secreción de ambos tejidos (corticosteroides y catecolaminas

respectivamente). Por algunos estudios llevados a cabo durante los últimos años, se ha postulado un importante papel para los glucocorticoides en la función de las células de la médula adrenal (Pohorecky y Wurtman, 1971), indicándose que la actividad de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa, que cataliza la conversión de adrenalina a partir de noradrenalina en la glándula adrenal, podría estar bajo un control hormonal ejercido por los glucocorticoides (Wurtman y Axelrod, 1965, 1966); también se ha indicado que las variaciones en los niveles de adrenalina en glándula adrenal, observadas por algunos investigadores en la rata durante las 24 horas del día, podrían quizás estar de alguna manera relacionadas con el ritmo circadiano de las hormonas adrenocorticales (Scheving y col., 1968b).

En base a diferentes estudios fundamentalmente farmacológicos, se ha sugerido la existencia de una cierta relación entre variaciones en el metabolismo de catecolaminas en cerebro y la función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en distintas situaciones (Battacharya y Marks, 1969; Ganong, 1970; Scapagnini y col., 1970; VanLoon y col., 1971a, b; Borrell y Borrell, 1977). Uno de los planteamientos experimentales utilizados es que la administración de reserpina,

fármaco que además de producir descensos en el contenido de catecolaminas impide la recaptación de éstas en los gránulos de almacenamiento, induce en la rata una hipersecreción de corticosterona, mientras que fármacos como iproniazid y otros inhibidores de la enzima monoamino oxidasa, que interviene en el catabolismo de estas monoaminas y que por tanto producen aumentos en los niveles de catecolaminas, reducen la secreción de corticosterona (Ganong y Lorenzen, 1967; Marks y col., 1970).

En esta misma línea, más recientemente, diversos autores (Scapagnini y col., 1970) indican una alteración en la periodicidad circadiana en la secreción de corticosterona plasmática en ratas con niveles infranormales de dopamina y noradrenalina inducidos por la administración del fármaco α -metil-p-tirosina, inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa que cataliza el paso de L-tirosina a L-DOPA, postulando estos autores una correlación negativa entre el contenido de noradrenalina en el hipotálamo y el nivel de corticosterona en plasma, sugiriendo que las catecolaminas pudieran ser mediadores neuroquímicos de un sistema inhibidor de la secreción de ACTH localizado a nivel hipotalámico.

Sin embargo, aún cuando la participación de los diversos neurotransmisores en el control de la secreción de las hormonas de la hipófisis anterior, particularmente del ACTH, ha sido aceptado por distintos investigadores, no está todavía aclarado el posible papel de los mismos en distintas situaciones y en especial, en la regulación de las variaciones circadianas de los niveles de hormonas adrenocorticales.

Hans Selye (1936) aportó el concepto de "stress" para indicar que el organismo reacciona frente a cualquier estímulo físico y/o emocional que tienda a alterar su equilibrio homeostático, mediante una serie de reacciones de defensa y de adaptación en las que se encuentra implicado directamente el eje hipófisis-adrenal, constituyendo la adaptación a los estímulos una de las actividades fisiológicas características del organismo vivo.

Dadas las fluctuaciones rítmicas que presentan los niveles de corticosteroides a lo largo de las 24 horas del día, que se traducen en el ritmo circadiano de los mismos, algunos autores han intentado esclarecer con la ayuda de distintos modelos experimentales, si la magnitud en la res-

puesta adrenocortical inducida por la aplicación de un "stress" depende o no de la hora del día en que se aplica dicho estímulo.

Por un lado, Zimmermann y Critchlow (1967) indican que las variaciones fisiológicas en los niveles basales de corticosterona en plasma en un período de 24 horas, no parecen influir en la respuesta adrenocortical a un estímulo inducido por éter o inmovilización, ya que observan incrementos similares en los niveles de corticosterona en plasma tanto si el "stress" es aplicado por la mañana, con valores basales bajos, como por la tarde cuando dichos niveles son superiores a los de por la mañana. Estos autores, a la vista de los resultados, postulan que por lo menos en la rata hembra, no parece existir ningún tipo de interacción entre los mecanismos encargados de la regulación del ritmo circadiano en los niveles de ACTH y/o corticosteroides y aquellos que controlan la liberación de ACTH inducida por la aplicación de un estímulo.

Gibbs (1970), suprimiendo las variaciones circadianas de corticosterona mediante la administración de dexametasona en una dosis suficiente para no impedir la respues-

ta al "stress" por éter, observa un incremento superior en la secreción de corticosterona en respuesta al éter por la tarde, a una hora del día en que el animal intacto tendría los niveles basales de corticosterona altos, que por la mañana cuando dichos valores serían inferiores a los de la tarde, concluyendo este autor que se produce una mayor liberación de ACTH en respuesta al estímulo aplicado por la tarde que por la mañana.

Posteriormente Dunn y col. (1972), utilizando ratas de ambos sexos, analizan las variaciones en los niveles de hormonas adrenocorticales en plasma y en glándula adrenal tanto en condiciones basales como en situaciones de "stress", por éter e inmovilización, a lo largo de las 24 horas del día; observan que ambos tipos de estimulación inducen siempre incrementos en los niveles de corticosterona en plasma a cualquier hora del día y que estos incrementos son superiores por la mañana que por la tarde, sugiriendo que los aumentos inducidos por la aplicación del "stress" en los niveles de corticosterona en plasma varían de un modo circadiano y que es muy difícil tratar de asegurar la existencia de alguna posible interacción entre los mecanismos que regulan la respuesta del eje hipófisis-adrenal a

un estímulo dado, de aquellos encargados de la modulación del ritmo circadiano en los niveles basales de hormonas adrenocorticales.

Pero, situaciones de "stress" además de producir una hipersecreción de hormonas adrenocorticales, según algunos autores pueden inducir una estimulación del sistema nervioso simpático que se traduce en descensos en los niveles de catecolaminas en la glándula adrenal y modificaciones en el metabolismo de diversos neurotransmisores en el cerebro (Vogt, 1954).

Maynert y Levi (1964) observan descensos en la concentración de noradrenalina en cerebro y catecolaminas en la glándula adrenal después de exponer a los animales a temperaturas de 4°C y también por estimulación eléctrica en las extremidades de las ratas. Otros autores (Gordon y col., 1966), sometiendo a las ratas a un fuerte ejercicio muscular, encuentran también ligeros descensos en la concentración de noradrenalina en cerebro y de adrenalina en glándula adrenal, observando que estos descensos son mayores cuando a los animales se les ha inhibido la síntesis de catecolaminas por la administración de α -metil-p-tirosina, sugiriendo que

en respuesta al "stress", además de un aumento en la liberación de catecolaminas de la glándula adrenal y en cerebro, se producen incrementos en la velocidad de síntesis de estas bioaminas.

Bliss y col. (1968) así como Thierry y col. (1968), observan también un incremento en la velocidad de síntesis de la noradrenalina, después de inhibir su biosíntesis, en ratas sometidas a estimulación eléctrica en las extremidades. Moore y Lariviere (1964), indican descensos significativos en el contenido de noradrenalina en cerebro de ratas sometidas también a una descarga eléctrica en las extremidades o al obligarlas a nadar durante cuatro horas consecutivas, indicando que el tratamiento previo con anfetamina, fármaco que induce una reducción en la concentración de noradrenalina en el cerebro sin afectar los niveles de dopamina, potencia este descenso en aquellos animales sometidos posteriormente a un choque eléctrico; estos autores postulan que ambos tipos de "stress" inducen una estimulación de las neuronas del sistema nervioso simpático central, modificando la neurotransmisión, y provocando descensos en el contenido de noradrenalina en cerebro, si bien no observan variaciones en los niveles de dopamina.

Kvetnansky y Mikulaj (1970), han observado que la inmovilización en ratas induce una liberación de catecolaminas que se traduce en descensos en el contenido de adrenalina en la glándula adrenal e incrementos en la excreción en orina de esta hormona, si bien después de la inmovilización repetida diariamente durante varias semanas, la excreción de adrenalina permanece elevada aún cuando el descenso en el contenido adrenal de esta hormona es menos marcado. De estos resultados, los autores sugieren que la inmovilización repetida acelera la síntesis de catecolaminas induciendo aumentos en la actividad de las enzimas encargadas de dicha síntesis en la glándula adrenal, lo que conduce a una adaptación de la médula adrenal a esa situación de "stress" que permite un aumento en la capacidad de ese órgano para reemplazar las catecolaminas que está liberando.

Por otro lado, Rivas y Borrell (1971) estudiando los niveles tisulares de corticosteroides y catecolaminas en gatos tras la administración prolongada con ACTH, han sugerido que el descenso de adrenalina en las glándulas suprarrenales que observan podría ser atribuido al previo descenso de noradrenalina y por tanto que aún cuando los niveles de glucocorticoides puedan regular la actividad de

la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (Wurtman y Axelrod, 1965, 1966) no sería éste un factor primordial implicado en la formación de adrenalina, al menos en el gato intacto. Estos autores observan además que la dexametasona hace descender la noradrenalina en suprarrenales, disminuyendo también la excreción urinaria de esta hormona y no aumentando la concentración de adrenalina en suprarrenales ni en orina.

Los descensos en los niveles de noradrenalina en cerebro observados por distintos autores, así como el incremento en la velocidad de síntesis de esta amina, que se produce en los animales en respuesta a diferentes condiciones de "stress", ha conducido a la hipótesis de una posible participación de los mecanismos monoaminérgicos en el control de la secreción de ACTH bajo estas situaciones.

Varios estudios realizados desde un punto de vista esencialmente farmacológico, indican que el incremento en la liberación de noradrenalina en cerebro inducida por el "stress", podría actuar inhibiendo la secreción de ACTH y según algunos autores (Fuxe y col., 1970), parece probable que en situaciones de "stress" son activadas distintas vías

neurales que producen, tanto una estimulación como una inhibición en la secreción de ACTH y que la función de las neuronas centrales noradrenérgicas, podría ser el prevenir una excesiva secreción de esta hormona.

Por otro lado, Anichkov y Ryzhenkov (1973) utilizando ratas como animal de experimentación, indican que a pesar de la inhibición de la síntesis de catecolaminas inducida por la administración de α -metil-p-tirosina, los animales presentan niveles normales de 11-hidroxycorticosteroides en plasma, así como una normal activación del eje hipófisis-adrenal en respuesta a la aplicación de un "stress" por inmovilización.

También estudios llevados a cabo por Abe e Hiroshige (1974), están a favor de una falta de correlación entre los niveles de catecolaminas en cerebro y la secreción de ACTH, tanto en condiciones basales como en situaciones de "stress", pues a pesar de los cambios en el contenido de noradrenalina en el hipotálamo inducidos por la administración de drogas que inhiben su síntesis o bloquean su catabolismo, los animales mantienen el ritmo circadiano de los niveles de corticosteroides en plasma así como la respuesta de esta hormona

a la estimulación por éter y laparatomía.

De todos estos estudios y de otros similares realizados bajo diferentes situaciones experimentales, se puede indicar que aún cuando parece existir una posible participación de las catecolaminas del cerebro en el control de la secreción de ACTH, no está todavía aclarado el papel que puedan jugar estos neurotransmisores como mediadores en la respuesta del organismo a distintas situaciones de emergencia.

Dada la estrecha relación que parece existir entre el sistema nervioso y el endocrino, podría suponerse que fármacos con propiedades sedantes y/o anticonvulsivantes puedan ejercer su acción en el sistema endocrino a través de una acción en el sistema nervioso. Aún cuando se desconocen todavía los mecanismos por los cuales estos fármacos influyen en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, se postula la posibilidad de que estas drogas al interferir con los mecanismos de acción de neurotransmisores del cerebro, puedan intervenir en la modulación de la secreción de ACTH.

Mäkela y col. (1959) evaluando el índice de secreción de ACTH por medio de los niveles de ácido ascórbico en la glándula adrenal, observaron que la administración en do-

sis única de meprobamato, droga anticonvulsivante con propiedades farmacológicas similares a los barbitúricos, era capaz de inhibir la secreción de ACTH que se produce en respuesta a diferentes tipos de "stress"; sin embargo en animales tratados crónicamente con la droga observaron el desarrollo de adaptación al efecto de la misma sobre la secreción de ACTH, de forma que en ratas tratadas durante dos semanas con el fármaco, el descenso de ácido ascórbico adrenal inducido por el "stress" era similar al obtenido en los animales no tratados con la droga.

Distintos autores (Corrodi y col., 1971; Lidbrink y col., 1972), han postulado que los incrementos observados en la velocidad de síntesis de noradrenalina en cerebro inducidos por la inmovilización, pueden ser bloqueados por la previa administración de tranquilizantes del grupo de las benzodiazepinas, indicándose que probablemente estos fármacos al igual que los barbitúricos reducirían la neurotransmisión central noradrenérgica y dopaminérgica y protegerían a las neuronas de una posible hiperactividad. También son varios los estudios en que se ha observado que la anestesia inducida por barbitúricos, conduce a descensos en la velocidad de síntesis en cerebro de la dopamina en ratas (Corrodi

y col., 1966) y de la noradrenalina en ratones (Persson y Waldeck, 1971), y que la liberación de noradrenalina inducida por la aplicación de un "stress" puede ser bloqueada por la anestesia con fenobarbital (Maynert y Levi, 1964).

Es conocido desde hace tiempo que situaciones de "stress" emocional y/o síquico inducen una hipersecreción de hormonas adrenocorticales (Mason y col., 1968); estudios llevados a cabo en los últimos años (Lathi y Barsuhn, 1974, 1975) apuntan que esta estimulación adrenocortical puede ser inhibida en la rata por el tratamiento previo con drogas de tipo sedante y/o ansiolítico, indicando una relación cuantitativa directa entre la dosis de fármaco empleado y la intensidad en el efecto observado.

Aún cuando la difenilhidantoína es un fármaco muy utilizado en el tratamiento de la epilepsia y en otras enfermedades (Bogoch y Dreyfus, 1975), son escasos los trabajos aparecidos en la literatura respecto al efecto que la administración aguda o crónica con esta droga puede tener sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Dado que desde hace tiempo se viene utilizando la concentración de ácido ascórbico en la glándula adrenal,

como medida indirecta de la secreción de ACTH, los primeros trabajos respecto al posible efecto que el tratamiento con difenilhidantoína podía tener sobre la actividad endocrina se llevaron a cabo determinando la concentración de este ácido en la glándula adrenal de animales tratados con el fármaco. Se ha descrito (Bonnycastle y Bradley, 1960), que el tratamiento crónico con 100 mg/kg de difenilhidantoína dos veces al día durante tres semanas inhibe el descenso en la concentración de ácido ascórbico en la glándula adrenal que se produce en respuesta a la adrenalectomía unilateral y a otros tipos de estímulos, habiendo sido confirmado, en parte, este hecho posteriormente por Dill (1966); sin embargo, el incremento en los niveles de corticosterona en plasma que se produce en respuesta al "stress" por laparatomía, no es inhibido en ratas tratadas previamente con difenilhidantoína, aún cuando es patente una disminución en la respuesta de los animales cuando son sacrificados a distintos intervalos de tiempo después de la aplicación del "stress" (Dill, 1966).

Tampoco encontramos concordancia en los resultados obtenidos en humanos sometidos a tratamiento con difenilhidantoína. Se ha descrito en personas adultas que reciben

esta droga durante un corto periodo de tiempo, un incremento en la excreción en orina de 17-hidroxycorticosteroides seguido posteriormente, si la administración de la droga se mantiene durante dos meses, de un descenso en el nivel de estos compuestos en orina, acompañado de cambios similares aunque menos marcados en la excreción de 17-cetosteroides (Costa y col., 1955). Estos estudios parecen indicar que la administración de difenilhidantoína puede producir al principio un efecto estimulante sobre el eje hipófisis-adrenal seguido de una acción depresora si el tratamiento se mantiene durante mucho tiempo.

Bray y col. (1954), observan que el incremento en los niveles de 17-hidroxycorticosteroides en plasma que se produce en respuesta a la administración de ACTH en niños epilépticos tratados con difenilhidantoína, es de una magnitud menor al obtenido en niños normales no sometidos a ningún tratamiento farmacológico. Otros autores (Asfeldt y Buhl, 1969) observan una respuesta alterada a la administración oral de distintas dosis de dexametasona en enfermos epilépticos sometidos a tratamiento con difenilhidantoína, postulando que este fármaco parece interferir en parte con los mecanismos que modulan la secreción de ACTH, si bien

observan en estos enfermos niveles de corticosteroides en plasma en distintas horas del día no significativamente diferentes de los obtenidos a esas mismas horas del día en sujetos sanos.

De los estudios mencionados y otros similares, parece desprenderse que la terapia con difenilhidantoína parece influir en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal modificando la secreción de ACTH; no obstante, debido fundamentalmente a los diferentes esquemas de administración empleados por los distintos investigadores, así como a la variabilidad de los parámetros utilizados para evaluar la función adrenocortical, no se pueden establecer conclusiones acerca del efecto de este fármaco sobre la función endocrina.

También desde hace tiempo se viene investigando el mecanismo por el cual la difenilhidantoína ejerce una acción anticonvulsivante; resultados de algunos estudios llevados a cabo en los últimos años parecen atribuir a las catecolaminas del cerebro un papel fundamental en este proceso. Se ha observado (Hadfield, 1972) que este fármaco, "in vitro", parece interferir con los mecanismos de inactivación por recaptación de las catecolaminas; otros estudios (Snider y

Snider, 1977) indican modificaciones en los niveles en cerebro de dopamina y noradrenalina así como en la velocidad de síntesis de estas catecolaminas en distintas zonas del cerebro de ratas tratadas durante dos semanas con 100 mg/kg de difenilhidantoína y sacrificadas 18 horas después de la última inyección.

Recientemente, Elliott y col. (1977) utilizando varios modelos experimentales con el fin de estudiar la influencia de la difenilhidantoína sobre los sistemas de neuronas centrales dopaminérgicas, observaron unicamente un efecto bioquímico positivo, en términos de un descenso en la velocidad de síntesis de la dopamina, en el cerebro de ratones tratados con 40 mg/kg de difenilhidantoína y sacrificados dos horas y media después de la inyección, no encontrando variaciones con dosis más altas y a otros intervalos de tiempo; estos autores concluyen que este fármaco puede ejercer algún efecto sobre las neuronas dopaminérgicas en el cerebro pero la naturaleza de esta interacción es bastante compleja y piensan que quizás se pueda especular en base a una acción preferente del fármaco sobre determinados receptores dopaminérgicos a nivel cerebral.

P L A N T E A M I E N T O

Desde hace tiempo se conocen las variaciones que presentan dentro de las 24 horas del día, los niveles de hormonas adrenocorticales que se traducen en el ritmo circadiano de las mismas (Critchlow y col., 1963; Krieger y Krieger, 1966); así mismo se sabe que situaciones de emergencia provocan en el organismo animal una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que conduce a una hipersecreción de glucocorticoides (Allen y col., 1973), una estimulación del sistema nervioso simpático que puede llegar a inducir descensos en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal (Kvetnansky y Mikulaj, 1970), así como modificaciones en el metabolismo de diversos neurotransmisores en el cerebro (Kobayashi y col., 1976). Sin embargo, son pocos los trabajos realizados con el fin de esclarecer si las variaciones diarias en los niveles de corticosteroides pueden influir de algún modo en la respuesta a un estímulo aplicado a distintos tiempos del día.

Por otro lado, son escasos y contradictorios los resultados de los estudios llevados a cabo con objeto de establecer si los diversos neurotransmisores del cerebro están implicados en el control de la secreción de ACTH tanto en

condiciones basales como en la respuesta a situaciones de "stress" (Abe e Hiroshige, 1974).

Por ello y en base a lo expuesto en la introducción, consideramos de interés plantear unas experiencias con el fin de estudiar la influencia que la aplicación de un estímulo puede tener conjuntamente sobre las hormonas de la corteza y médula adrenal y sobre las catecolaminas del cerebro. Para ello sometimos ratas a "stress" de inmovilización, toda vez que según la bibliografía (Dallman y Jones, 1973) este tipo de estímulo es efectivo en inducir en esta especie animal una hipersecreción de corticosterona y determinamos bajo estas condiciones experimentales, los niveles de esta hormona en glándula adrenal y plasma así como la concentración de catecolaminas en glándula adrenal y en cerebro, sacrificando los animales a dos horas del día en los que en la rata intacta comprobamos tenía niveles significativamente diferentes de corticosterona. También determinamos la concentración adrenal de ácido ascórbico dado que según algunos autores (Vernikos-Danellis, 1965), un descenso en los niveles de este compuesto proporcionaría una medida de la hipersecreción de ACTH, si bien el exacto papel del ácido ascórbico en la estereidogénesis adrenal no está todavía

aclarado.

Utilizamos ratas macho cuya biosíntesis de corticosteroides está dirigida esencialmente a la formación de 17-desoxicorticosteroides, especialmente corticosterona y cuyo organismo biosintetiza ácido ascórbico.

Asimismo, aún cuando se ha venido estudiando el efecto que la administración de drogas con propiedades sedantes y/o anticonvulsivantes puede tener sobre distintos mecanismos neurales así como sobre la función del eje hipófisis-adrenal, en la bibliografía consultada no encontramos uniformidad en las conclusiones de distintos autores acerca de la posible influencia que la administración aguda y/o crónica con este tipo de fármacos puede tener sobre la función adrenocortical.

Se utiliza muy frecuentemente el fenobarbital y la difenilhidantoína, así como su asociación farmacológica en el tratamiento de muchos estados convulsivos. Sin embargo, y debido quizás entre otros factores a los diferentes esquemas de administración empleados en los distintos trabajos, no está todavía aclarado el posible efecto que el tratamiento con fenobarbital y/o difenilhidantoína tiene sobre los

niveles de corticosterona circulante y de corticosterona, catecolaminas y ácido ascórbico en glándula adrenal. Además casi todos estos trabajos han sido realizados utilizando dosis agudas anestésicas de los compuestos. Por ello hemos considerado interesante, tanto desde un punto de vista de investigación básica como por la repercusión que tiene el empleo de estos fármacos, estudiar la respuesta de los animales al tratamiento prolongado con fenobarbital y utilizando dosis subanestésicas de dicho compuesto.

Así también son escasos los estudios acerca del efecto que la administración de otro fármaco de carácter anticonvulsivante, la difenilhidantoína, tiene sobre las catecolaminas del cerebro; algunos autores (Bogoch y Dreyfus, 1975) han indicado la posibilidad de que esta droga ejerza su acción modificando el metabolismo de algunos de los neurotransmisores en el cerebro, aunque no está aclarado el mecanismo de esta posible interacción.

Por todo lo expuesto, pensamos realizar grupos experimentales con objeto de investigar el efecto que la administración durante ocho días consecutivos de fenobarbital y/o difenilhidantoína tiene sobre la función del eje hipó-

fisis-adrenal evaluada por los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal así como sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y catecolaminas en la glándula adrenal de ratas macho intactas o sometidas a "stress" de inmovilización; estas experiencias nos permitirían asimismo estudiar, si variaciones en los niveles de estos parámetros inducidas por la sola aplicación del "stress" de inmovilización, son modificadas por el previo tratamiento con estos fármacos.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Utilizamos en nuestro estudio ratas macho Wistar de peso comprendido entre 250 y 350 gramos. Los animales son criados y mantenidos en nuestro propio estabulario provisto de un adecuado sistema de ventilación y bajo condiciones de temperatura constante ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), control automático de luz artificial con un ciclo de 12 horas de luz desde las 7 hasta las 19 horas y 12 de oscuridad cada 24 horas y alimentadas con una dieta comercial (Sanders) especial para ratas.

Tres días antes del comienzo de cualquier tratamiento los animales son pesados y separados en grupos de cuatro ratas por jaula.

ADMINISTRACION DE LOS FARMACOS

Los compuestos utilizados son inyectados por vía subcutánea en dosis diaria de:

- Fenobarbital (Merck); dosis subanestésica de 50 mg/kg de peso corporal.

- Difenilhidantoinato sódico (Barcia, Productos farmacéuticos); dosis de protección de la crisis convulsiva en la rata, 60 mg/kg de peso.

- Los compuestos son disueltos en una solución al 80% de propilengicol y 20% de alcohol etílico.

- Los animales control reciben 0,5 ml del vehículo.

La administración de fenobarbital y/o difenilhidantoína se realiza durante ocho días consecutivos y a distintos tiempos: a) entre las 9-10 horas y b) entre las 16-17 horas. Los animales del grupo a) son sacrificados entre las 17 y 18 horas y los del grupo b) entre las 10 y 11 horas.

APLICACION DEL "STRESS" DE INMOVILIZACION

Al finalizar el tratamiento y dos horas antes del sacrificio, grupos de animales son sometidos a inmovilización, colocándolos en posición decúbito ventral en una rejilla metálica de 30 cm de largo por 20 cm de ancho, sujetando las extremidades mediante un material adecuado con el fin de que no puedan soltarse, impidiéndoles todo movimiento a excepción de la cabeza.

MATERIAL BIOLOGICO

El sacrificio se realiza por decapitación con la ayuda de una guillotina, recogiendo la sangre sobre tubos heparinizados, centrifugándose posteriormente a 1500 g durante 20 minutos y separando inmediatamente el plasma. Transcurrido aproximadamente un minuto desde la decapitación, se procede a la extracción del cerebro y glándulas adrenales, las cuales desprovistas de tejido graso extra adrenal son pesadas en una balanza de torsión. Durante la manipulación y homogeneización los tejidos son mantenidos en hielo y posteriormente son conservados en congelador a - 20°C.

HOMOGENEIZACION DE LOS TEJIDOS

Glándulas adrenales. La homogeneización de este tejido se realiza en agua bidestilada al 1% (peso tejido/volumen de agua) para la determinación de corticosterona y ácido ascórbico y con ácido clorhídrico 0,01 N al 3% (gramos/mililitro) para la determinación de catecolaminas. En los tres casos se utiliza un homogeneizador de vidrio.

Cerebro. Se homogeneiza en un aparato "Virtis" en un volumen adecuado (1:3 peso/volumen) en ácido perclórico

0,4 N; se centrifuga a 27000 g durante veinte minutos a 4°C en ultracentrífuga; el sobrenadante se recoge en probetas adecuadas mantenidas en hielo y el sedimento se vuelve a homogeneizar en una proporción de 1:2,5 (peso/volumen) del mismo ácido realizando la misma operación de centrifugación; el sobrenadante se adiciona al anterior y se completa a un volumen total de 1:6 (peso/volumen) con ácido perclórico 0,4 N.

DETERMINACION DE CATECOLAMINAS EN GLANDULA ADRENAL

Para la determinación de catecolaminas en la glándula adrenal seguimos el método de Shore y Olin (1958) con modificaciones de Callingham y Cass (1963).

El procedimiento implica la extracción de las catecolaminas del homogeneizado de tejido adrenal con butanol saturado de cloruro sódico; una parte alícuota de esta fase orgánica es extraída con n-heptano y ácido clorhídrico, pasando las catecolaminas ahora a la fase ácida que se separa y se utiliza para la reacción fluorimétrica.

Extracción y purificación: En un matraz Erlenmeyer de 50 ml de capacidad que contiene 2,5 g de NaCl y 15 ml de butanol se adiciona 0,1 ml del homogeneizado del tejido. Después de agitación rápida durante 60 minutos en agitador mecánico se pasa a tubos y se centrifuga a 900 g durante 10 minutos; una parte alícuota de 10 ml del extracto en butanol se lleva a matraces de 100 ml de capacidad que contienen 20 ml de heptano y 3,5 ml de HCl 0,01 N. Se agita intensamente durante 5 minutos y se centrifuga a 900 g durante 5 minutos desechando la fase orgánica. Sobre este extracto ácido se realizará la valoración cuantitativa.

Toda vez que la glándula adrenal de la rata contiene principalmente adrenalina y una pequeña proporción de noradrenalina (West, 1955) determinamos catecolaminas totales referidas a adrenalina y llevamos a lo largo del método un estandar adicionando al problema 1 μ g de adrenalina y un patrón directo de igual concentración que el anterior, lo que nos permite calcular la recuperación del método y la concentración de catecolaminas en las muestras.

Valoración cuantitativa: Una vez extraídas las catecolaminas del tejido, se forman los correspondientes compuestos fluorescentes mediante la reacción del trihidroxiindol a pH 5, dado que a este pH se oxida tanto la adrenalina como la noradrenalina.

A una serie de tubos de ensayo conteniendo 0,25 ml de solución tampón a pH 5 se añade una alícuota de 0,75 ml del extracto ácido, adicionando 0,025 ml de solución alcohólica de iodo; se deja transcurrir la reacción durante cinco minutos y medio; se adiciona 0,05 ml de una solución de tiosulfato sódico con el fin de neutralizar el exceso de iodo. Una vez formados los cromocompuestos, se añade 0,25 ml de solución alcalina de ascorbato recientemente preparada.

Para cada muestra problema se lleva un blanco en el que se adiciona 0,075 ml de una mezcla de iodo-tiosulfato (1:2) con objeto de que no se lleve a cabo la reacción.

La serie de tubos de ensayo se colocan inmediatamente bajo una lámpara de luz ultravioleta por espacio de 15 minutos donde es activada la fluorescencia de las muestras.

La intensidad relativa de fluorescencia se determina en un espectrofotofluorímetro a una activación de 410 mμ y una emisión de 520 mμ, expresando los resultados en μg de adrenalina por gramo de tejido.

Reactivos:

- Acido clorhídrico (May & Baker); solución 0,01 N.
- n-Butanol (May & Baker), saturado de NaCl (Merck) y HCl 0,01 N; 1 litro de n-butanol se agita con 175 ml de HCl 0,01 N; añadir luego 125 g de NaCl y volver a agitar.
- n-Heptano (May & Baker); redestilado.
- Solución tampón Acetico-Acetato sódico 2 M, pH 5.
- Solución de iodo (May & Baker) 0,1 N en alcohol etílico al 95%.
- Solución de tiosulfato sódico (Merck) 0,1 M.

- Acido ascórbico (BDH), solución alcalina; 10 mg de ácido ascórbico se disuelven en 1 ml de H₂O bidestilada y 2 ml de OHNa 5 N.
- Solución patrón de adrenalina (BDH) en concentración de 1 mg/1 ml en HCl 0,01 N (conservado en nevera).
- Agua bidestilada.

DETERMINACION DE DOPAMINA Y NORADRENALINA EN CEREBRO

Utilizamos el método descrito por Shellenberger y Gordon (1971). Este método consiste en esencia en una extracción de las catecolaminas del extracto ácido por adsorción en alúmina a un pH alcalino adecuado, de donde son desplazadas con ácido perclórico diluído de cuya fase ácida se toman partes alícuotas para el desarrollo de la fluorescencia y posterior valoración cuantitativa de ambas bioaminas en la misma muestra. Los resultados son expresados en nanogramos por gramo de tejido.

Desarrollo del método: 6 ml del extracto ácido se llevan a un tubo de centrifuga (100 ml) y se añade solución de tricina en cantidad adecuada para lograr un pH de 9,1 a 9,2. Se adiciona 350 mg de alúmina activada y se agita suavemente en agitador mecánico durante 20 minutos; pasado este tiempo se centrifuga cinco minutos a 1000 g desechando

el sobrenadante; la alúmina que ha adsorbido las aminas se lava con 20 ml de agua bidestilada agitando un minuto y desechando la fase acuosa; se repite esta operación dos veces más y se elimina esta última agua de loción. Se añade 3 ml de ácido perclórico 0,05 N y se agita de nuevo durante 20 minutos, se centrifuga a 1000 g durante cinco minutos y del sobrenadante se toman dos partes alícuotas de 1 ml para la muestra problema y el blanco.

Se llevan a lo largo del método patrones de 400 ng de dopamina y noradrenalina, así como patrones directos de igual concentración; de esta manera se puede calcular el tanto por ciento de recuperación del método y la concentración de dopamina y noradrenalina en cada muestra.

Valoración cuantitativa: A una serie de tubos que contienen 1,5 ml de solución tampón fosfato-EDTA pH 7 se añade la muestra (1 ml) del extracto ácido problema, se adiciona 0,2 ml de solución de iodo agitando inmediatamente; se deja transcurrir la reacción exactamente dos minutos pasados los cuales se añade 0,5 ml de una solución alcalina de sulfito sódico mezclando de nuevo por agitación rápida; se dejan pasar dos minutos y se acidifica con 0,4 ml de áci-

do acético glacial.

En los blancos de las muestras correspondientes a los problemas se lleva a cabo la reacción invirtiendo el orden de adición de las soluciones de iodo y de sulfito sódico.

Se ponen todas las muestras en una estufa a 100°C durante 3-4 minutos; se colocan después en hielo 3-5 minutos y se determina la intensidad relativa de fluorescencia de la noradrenalina a temperatura ambiente en un espectrofotofluorímetro a una activación de 390 m μ y una emisión de 490 m μ . Se llevan de nuevo las muestras a la estufa a 100°C durante 35-40 minutos para activar la fluorescencia de la dopamina. Transcurrido este tiempo, se sacan los tubos de la estufa y se mantienen en hielo; una vez enfriados se lee la fluorescencia de la dopamina a una activación de 335 m μ y una emisión correspondiente a una longitud de onda de 375 m μ .

Reactivos:

- Ácido perclórico (BDH), solución 0,4 N; añadir a 1000 ml de esta solución 1 g de metabisulfito sódico y 0,5 g de EDTA (sal disódica del ácido diamino-etano-tetracético (BDH)).

- Oxido de aluminio (Merck, neutro, grado 1), activado; 200 g de alúmina se adicionan a un litro de ácido clorhídrico 2 N y se deja hervir durante 20 minutos. Lavar con 1 litro del mismo ácido y después con agua bidestilada hasta que el pH del agua esté comprendido entre 3 y 3,5. La alúmina así lavada se mantiene durante 2 horas en estufa a 200°C conservándola luego en desecador.

- Solución de tricina (Merck); disolver 17,9 g de N-[Tris(hidroximetil)metil] glicina y 25 g de EDTA en 1 litro de OHNa 0,525 N.

- Solución alcalina de sulfito sódico (BDH); tomar 1 ml de una solución que contiene 250 mg de sulfito sódico/ 1 ml de agua bidestilada y diluirlo hasta 10 ml con hidróxido sódico (Merck) 5 N.

- Solución tampón fosfato-EDTA de pH 7.

- Acido perclórico (BDH); solución 0,05 N.

- Soluciones patrones: L-noradrenalina y dopamina (BDH) en concentración de 1 mg/ml de ácido clorhídrico 0,01 N (conservado en nevera).

- Agua bidestilada.

DETERMINACION DE CORTICOSTEROIDES EN GLANDULA ADRENAL Y PLASMA

Seguimos la técnica de Matsumura y col. (1967) para la determinación de corticosteroides (corticosterona en la glándula adrenal y plasma).

El plasma o tejido homogeneizado es extraído con diclorometano, disolvente orgánico elegido en función del coeficiente de reparto para corticosterona entre el agua y el disolvente orgánico (Porter y Silber, 1957). Posteriormente con el reactivo T de Girard, (Jayle y Crépy, 1961) en una solución de ácido acético y etanol en la que se disuelve el residuo seco del extracto, se separan los esteroides cetónicos de los no cetónicos; las hidrazonas de los esteroides cetónicos formadas son muy lábiles y se hidrolizan facilmente a la temperatura ambiente y a un pH inferior a 6, por lo que es necesario enfriar rápidamente y adicionar carbonato sódico para neutralizar el ácido acético. Los compuestos no cetónicos que no han reaccionado con el reactivo T de Girard se extraen con éter etílico desechando la fase etérea; adicionamos a temperatura ambiente, ácido clorhídrico para hidrolizar las hidrazonas formadas. Se realiza una

posterior extracción con éter de petróleo con el fin de separar los esteroides cetónicos y la fase acuosa se extrae con diclorometano; en una parte alícuota del extracto se realiza la reacción de fluorescencia mediante la adición del reactivo sulfúrico/etanol.

Desarrollo del método: 1 ml de plasma ó 0,5 ml del homogeneizado del tejido son llevados, en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, hasta un volumen total de 7,5 ml con agua bidestilada y extraídos con 15 ml de diclorometano durante 10 minutos por agitación circular lenta en un agitador giratorio. Se pasan a tubos y se centrifugan 15 minutos a 1200 g para separar las dos fases, eliminando la fase acuosa. Se lava el extracto con 2 ml de OHNa 0,1 N agitando durante 20 segundos, centrifugando a 1200 g durante cinco minutos y desechando por aspiración la fase alcalina; se vuelve de nuevo a lavar con 2 ml de agua bidestilada y se centrifuga a 1200 g durante cinco minutos eliminándose la fase acuosa; la fase orgánica se deseca con 1 g de Na_2SO_4 anhidro evaporándose a sequedad una alícuota de 10 ml en atmósfera de nitrógeno y a 37°C .

Al residuo seco se adiciona 0,5 ml de reactivo T

de Girard incubando las muestras en baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Se enfrían los tubos rápidamente en hielo y se adiciona 3 ml de Na_2CO_3 0,4 M.

Se realiza una posterior extracción añadiendo 3 ml de eter etílico y agitando durante 1 minuto, centrifugando a 1200 g durante cinco minutos y eliminando la fase etérea. Con el fin de hidrolizar las hidrazonas formadas se añade 0,5 ml de HCl 6 N mezclando lentamente y dejando transcurrir la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se extrae de nuevo por agitación durante 1 minuto con 3 ml de éter de petróleo, eliminando la fase orgánica.

Una parte alícuota de 3,5 ml del extracto acuoso se extrae con 15 ml de diclorometano por agitación intensa durante 2 minutos, centrifugando durante 15 minutos a 1200 g eliminando la fase acuosa y desecando con 1 g de Na_2SO_4 anhidro.

Se separa una alícuota del extracto correspondiente a 10 ml a la que se adicionan 2 ml del reactivo ácido sulfúrico/etanol (3;1); se agita durante 20 segundos y se elimina la fase orgánica.

Se determina la intensidad relativa de fluorescencia exactamente a los 30 minutos de haber adicionado el reactivo, a una activación de 470 m μ y una emisión de 525 m μ en un espectrofotofluorímetro.

Se lleva a lo largo de todo el método un blanco y un patrón de 0,5 μ g de corticosterona. Se efectúa además en cada determinación la medida directa de la fluorescencia de 0,5 μ g de corticosterona. En función de estos datos se calcula el tanto por ciento de recuperación del método y la concentración de la muestra problema, expresando los resultados en μ g de corticosterona por 100 ml de plasma ó por gramo de tejido.

Reactivos:

- Diclorometano (Merck); redestilado.
- Hidróxido sódico (Merck); solución 0,1 N.
- Sulfato sódico anhidro (Merck).
- Reactivo T de Girard (hidrazida del cloruro de carboximetil-trimetil-amonio) (NBC); 100 mg se disuelven en 0,5 ml de ácido acético glacial y se completan con etanol redestilado hasta un volumen final de 5 ml.

- Eter etílico (Larramendi) redestilado sobre sulfato ferroso (Merck).
- Carbonato sódico (Merck); solución 0,4 M.
- Acido clorhídrico (May & Baker); solución 6 N.
- Eter de petróleo (BDH); redestilado y recogiendo solamente la fracción que destila de 30°C a 40°C.
- Acido sulfúrico (Merck).
- Alcohol etílico (Compañía de Alcoholes), previamente purificado; hervir a reflujo con OHK durante 8 horas y destilar; adicionar a este alcohol una mezcla de AgNO_3 y OHK, agitar varias veces y pasadas 24 horas redestilar de nuevo.
- Solución ácido sulfúrico/etanol al 75% (v/v).
- Solución patrón de corticosterona (4-Pregnen-11 β , 21-diol-3,20-diona) (Schwarz/Mann). Solución madre en etanol (100 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$), preparando a partir de ella una solución diluída de concentración 10 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$ y a partir de ésta, una segunda solución de concentración 1 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$, ambas en agua bidestilada.
- Agua bidestilada.

DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO EN GLANDULA ADRENAL

La técnica utilizada por nosotros es esencialmente la de Roe (1954); se basa en la oxidación del ácido L-ascórbico a ácido dehidro-L-ascórbico con carbón activo y posterior formación de osazona con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina en presencia de tiourea; disolución de la misma en ácido sulfúrico y lectura de la absorción en un espectrofotómetro. Con este método se determinan los ácidos L-ascórbico, dehidro-L-ascórbico y diceto-L-gulónico.

En el método de Roe la formación de osazona se realiza por incubación a 37°C durante 3 horas; sin embargo nosotros utilizamos la modificación de Borrell y Estévez (1967) incubando durante 24 horas, con lo que se logra una mayor sensibilidad.

Desarrollo del método: A 1 ml del homogeneizado del tejido, se adiciona gota a gota 6 ml de ácido tricloroacético al 6% agitando al mismo tiempo con una varilla de vidrio; pasados cinco minutos se centrifuga a 900 g durante 15 minutos; el sobrenadante se pasa a tubos de vidrio con tapón esmerilado y se adicionan 75 mg de carbón activado agitando durante 1 minuto. Se filtra por papel Whatman n°1 y se toman

partes alícuotas de 2 ml para la muestra problema y el blanco.

Se añade a los tubos problema 0,5 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina y se incuba durante 24 horas en estufa a 37°C. Los blancos se dejan en nevera. Pasado el tiempo de incubación se meten los tubos en hielo y una vez enfriados y sin sacar del hielo se adiciona gota a gota 2,5 ml de ácido sulfúrico al 85% agitando continuamente con una varilla hasta lograr la total disolución del precipitado. A los blancos se les adiciona 0,5 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina después del ácido sulfúrico. Se sacan los tubos del hielo y se dejan 30 minutos a la temperatura del laboratorio, determinando a continuación la intensidad del reactivo coloreado en un espectrofotómetro a 520 mμ.

Paralelamente se lleva un patrón de ácido ascórbico de 4 μg tratado de la misma forma que las muestras problema. Expresamos los resultados en μg de ácido ascórbico por gramo de tejido.

Reactivos:

- Acido tricloroacético (Riedel); soluciones al 4% y 6%.

- Acido sulfúrico (Merck); solución al 85%.
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (BDH); solución al 2% en ácido sulfúrico al 25% (v/v) a la que se añade tiourea (Koch-Light) para tener una concentración final del 4%.
- Carbón activo (Riedel), lavado con HCl al 10%, 200 g de carbón se hierven con 1 litro de HCl y se filtra, adicionando 1 litro de H₂O bidestilada; se mantiene en estufa durante 24 horas a 100°C.
- Solución patrón de ácido ascórbico (BDH). La solución madre se prepara en ácido tricloroacético al 4% en concentración de 1 mg/1 ml y a partir de ella se prepara una solución diluída de concentración 20 µg/1 ml también en ácido tricloroacético al 4%.

METODO ESTADISTICO

Para el análisis estadístico de los resultados hemos determinado la media aritmética y el error estándar de cada grupo de experiencias de la siguiente manera:

Sean x_i los valores individuales obtenidos para cada parámetro de nuestro estudio en un grupo de experiencias de n animales.

$$\text{Media aritmética: } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$\text{Error estándar de la media: E.S.} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

Para conocer si la media aritmética de un grupo de experiencias es significativamente diferente de la encontrada en otro relacionable, hemos empleado el parámetro "t" de Student (Snedecor, 1956).

Sean \bar{x}_a y \bar{x}_b las medias aritméticas encontradas para un determinado parámetro de nuestro estudio en dos grupos de experiencias a y b, de n_a y n_b número de animales respectivamente, siendo x_a y x_b los valores individuales de cada grupo:

$$t = (\bar{x}_a - \bar{x}_b) \sqrt{\frac{\frac{n_a n_b (n_a + n_b - 2)}{n_a + n_b}}{\left(\sum x_a^2 - \frac{(\sum x_a)^2}{n_a} \right) + \left(\sum x_b^2 - \frac{(\sum x_b)^2}{n_b} \right)}}$$

Obtenido el valor de "t", se determina en las tablas correspondientes el grado de significancia para $N = (n_a + n_b - 2)$ grados de confianza, que viene dado por el valor de P.

En este estudio, se ha estimado que la diferencia entre dos medias aritméticas es significativa cuando encontramos para P un valor menor a 0,05.

INSTRUMENTACION

- Balanza para pesar animales de Griffin & George, Ltd.
(Wembley, Gran Bretaña).
- Decapitador de Harvard Apparatus Co. Inc. (Massachusetts, USA).
- Balanza de torsión de White Electrical Inst.Co.Ltd.
(Worcestershire, Gran Bretaña).
- Balanzas, modelos H 16 y P 1200 de Mettler (Zurich, Suiza).
- Homogeneizador de vidrio de Quickfit & Quartz, Ltd.
(Staffordshire, Gran Bretaña).
- Homogeneizador "Virtis 45" de Virtis Co.Inc. (Gardiner, New York, USA).
- Ultracentrífuga Sorvall RC-2 (Norwalk, Connecticut, USA).
- Equipo desmineralizador R-100 de Seta (Madrid, España).
- Destilador de agua de Pobel, modelo 704 (Madrid, España).
- pH-metro, modelo 76 expandomatic de Beckman, Inst.Inc.
(California, USA).
- Agitador giratorio de NBS, Co. Inc. (New Jersey, USA).
- Agitador mecánico de Griffin & George Ltd. (Wembley, Gran Bretaña).

- Centrífugas, modelos Super-Medium y Major de MSE (Londres, Gran Bretaña).
- Espectrofotómetro SP 600 de Unicam Inst. (Cambridge, Gran Bretaña).
- Espectrofotofluorímetro Aminco-Bowman, modelo SPF de American Inst.Co.Inc. (Maryland, USA).
- Estufa de secado, modelo T 340 de Heraeus (Hanan, República Federal Alemana).

R E S U L T A D O S

ANIMALES INTACTOS

Realizamos en primer lugar la determinación de los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona, ácido ascórbico y catecolaminas en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales intactos, es decir no sometidos a ningún tratamiento y sacrificados a los tiempos mencionados en el apartado de materiales y métodos, por la mañana entre las 10 y 11 horas o por la tarde entre las 17 y 18 horas.

En la Tabla 1* podemos observar la existencia de diferencias en los niveles de corticosterona circulante, siendo el nivel casi cuatro veces superior en los animales sacrificados por la tarde respecto a los sacrificados por la mañana ($P = 0.01$) y siendo también significativamente su-

* En las Tablas presentamos los resultados agrupados por tratamiento; sin embargo en las figuras (3-14) están representados los niveles de cada parámetro individualmente, obtenidos después de todos y cada uno de los tratamientos.

perior el nivel de esta hormona en glándula adrenal ($P < 0.05$).

Estos resultados son consecuencia de la variación circadiana que bajo condiciones fisiológicas exhiben los niveles de hormonas adrenocorticales en la rata, siendo por ello estas dos horas las elegidas para el sacrificio de los animales en todos los experimentos de nuestro estudio.

La concentración de ácido ascórbico en glándula adrenal no presenta variaciones significativas entre la mañana y la tarde; en cuanto a los promedios obtenidos en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal, observamos en los animales sacrificados por la tarde, descensos significativos ($P < 0.01$) respecto a los sacrificados por la mañana.

Podemos ver (Tabla I), que los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro presentan aumentos significativos ($P < 0.05$) en las ratas sacrificadas por la tarde comparando los resultados con los sacrificados por la mañana.

ANIMALES CONTROL

Una vez conocidos los resultados correspondientes a los animales intactos, continuamos el trabajo determinando

en ratas sometidas a la administración durante ocho días del vehículo (propilenglicol - alcohol elítilico) los niveles de los parámetros de nuestro estudio.

Como se puede ver en la Tabla II y figura 1, los niveles de corticosterona circulante y en glándula adrenal, presentan en los animales sacrificados por la tarde aumentos significativos ($P < 0.001$ en plasma; $P < 0.01$ en glándula) respecto a los animales sacrificados por la mañana, hecho semejante al obtenido en los animales intactos.

Observamos descensos significativos ($P < 0.02$) en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal en los animales sacrificados por la tarde comparando los resultados con los obtenidos en los sacrificados por la mañana (Tabla II y figura 2).

Los niveles de ácido ascórbico en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro, no presentan variaciones significativas entre la mañana y la tarde (Tabla II, figuras 1 y 2).

Comparando los resultados obtenidos en los animales control frente a los correspondientes intactos sacrificados

TABLA I

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona, ácido ascórbico y catecolaminas en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales INTACTOS sacrificados por la mañana o por la tarde.

	<u>Mañana</u>	<u>Tarde</u>	<u>"p"</u>
<u>Plasma</u> (µg/100 ml)			
Corticosterona	7,8 ± 2,21	27,3 ± 3,42	< 0.01
<u>Glándula</u> (µg/g)			
Corticosterona	26,8 ± 5,08	40,9 ± 3,58	< 0.05
Acido ascórbico	5050 ± 210	4560 ± 164	ns
Catecolaminas	1285 ± 108	921 ± 29	< 0.01
<u>Cerebro</u> (ng/g)			
Dopamina	943 ± 50	1068 ± 25	< 0.05
Noradrenalina	439 ± 19	502 ± 18	< 0.05

Promedios ± E.S. de 8-11 animales.

TABLA II

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona, ácido ascórbico y catecolaminas en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales CONTROL sacrificados por la mañana o por la tarde.

	<u>Mañana</u>	<u>Tarde</u>	<u>"p"</u>
<u>Plasma</u> (µg/100 ml)			
Corticosterona	8,5 ± 2,44	30,7 ± 1,34	< 0.001
<u>Glándula</u> (µg/g)			
Corticosterona	21,3 ± 4,42	48,5 ± 4,00	< 0.01
Acido ascórbico	5215 ± 257	5048 ± 212	ns
Catecolaminas	1268 ± 128	882 ± 55	< 0.02
<u>Cerebro</u> (ng/g)			
Dopamina	1011 ± 21	1089 ± 43	ns
Noradrenalina	427 ± 14	455 ± 13	ns

Promedios ± E.S. de 6-8 animales.

TABLA III

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona, ácido ascórbico y catecolaminas en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales INTACTOS y CONTROL, sacrificados por la mañana.

	<u>Intactos</u>	<u>Controles</u>	<u>"p"</u>
<u>Plasma</u> (µg/100 ml)			
Corticosterona	7,8 ± 2,21	8,5 ± 2,44	ns
<u>Glándula</u> (µg/g)			
Corticosterona	26,8 ± 5,08	21,3 ± 4,42	ns
Acido ascórbico	5050 ± 210	5215 ± 257	ns
Catecolaminas	1285 ± 108	1268 ± 128	ns
<u>Cerebro</u> (ng/g)			
Dopamina	943 ± 50	1011 ± 21	ns
Noradrenalina	439 ± 19	427 ± 14	ns

Promedios ± E.S. de 6-11 animales.

TABLA IV

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona, ácido ascórbico y catecolaminas en glándula adrenal y de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales INTACTOS y CONTROL sacrificados por la tarde.

	<u>Intactos</u>	<u>Controles</u>	<u>"p"</u>
<u>Plasma</u> (µg/100 ml)			
Corticosterona	27,3 ± 3,42	30,7 ± 1,34	ns
<u>Glándula</u> (µg/g)			
Corticosterona	40,9 ± 3,58	48,5 ± 4,00	ns
Acido ascórbico	4560 ± 164	5048 ± 212	ns
Catecolaminas	921 ± 29	882 ± 55	ns
<u>Cerebro</u> (ng/g)			
Dopamina	1068 ± 25	1089 ± 43	ns
Noradrenalina	502 ± 18	455 ± 13	ns

Promedios ± E.S. de 6-11 animales.

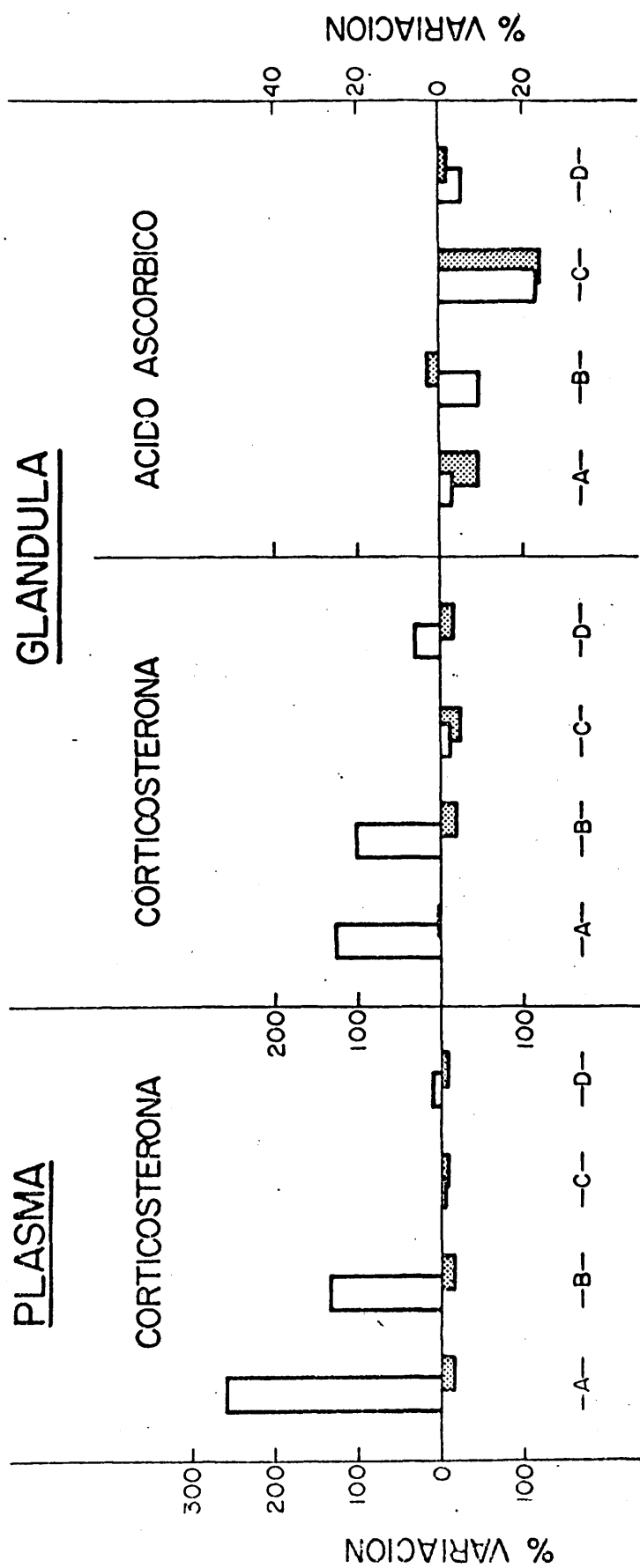


Figura 1

Variaciones en los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal de animales sacrificados por la tarde frente a los correspondientes grupos de animales sacrificados por la mañana, sometidos a inmovilización.

Resultados expresados en tanto por ciento de variación.

A: Controles; B: Fenobarbital; C: Difenhidantoína; D: Fenobarbital + Difenhidantoína.

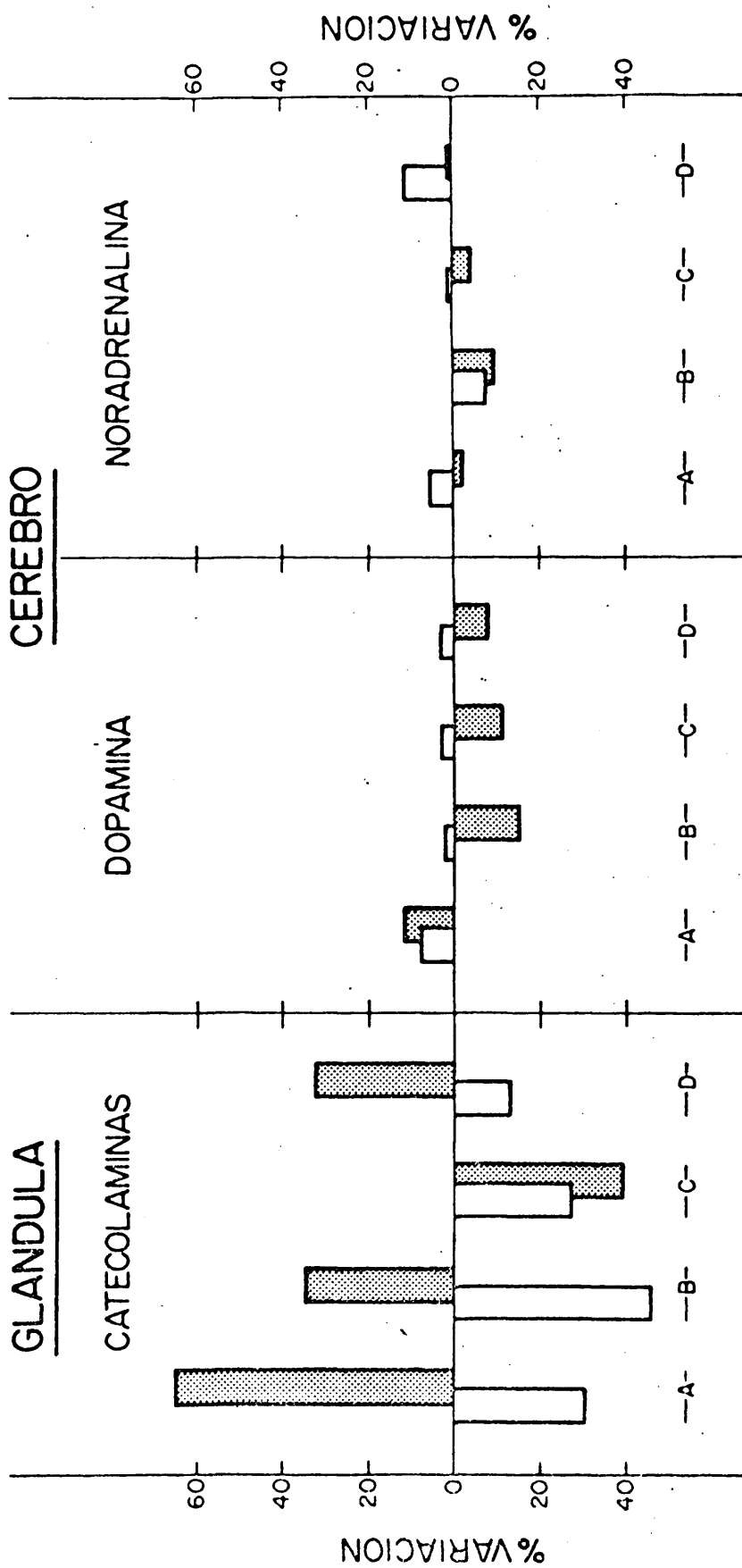




Figura 2

Variaciones en los niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro de animales sacrificados por la tarde frente a los correspondientes grupos de animales sacrificados por la mañana, sometidos  o no  a inmovilización.

Resultados expresados en tanto por ciento de variación.

 A) Controles;  B) Fenobarbital;  C) Difenilhidantoína;  D) Fenobarbital + Difenilhidantoína.

a los dos tiempos del día, no encontramos diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados (Tablas III y IV).

ANIMALES CONTROL SOMETIDOS A INMOVILIZACION

Una vez conocidos los niveles de los parámetros de nuestro estudio en animales intactos y control, sacrificados por la mañana o por la tarde, continuamos el trabajo planteado, estudiando la respuesta al "stress" de inmovilización durante dos horas en animales tratados previamente durante ocho días consecutivos con el vehículo.

En las Tablas V y VI se pueden ver los promedios de los valores obtenidos en los animales control y sometidos a inmovilización, así como las variaciones observadas al comparar los resultados con los correspondientes animales control no sometidos a inmovilización y sacrificados por la mañana o por la tarde.

Observamos en la Tabla V que en respuesta al "stress" se producen aumentos significativos en los niveles de corticosterona en plasma ($P < 0.001$) y en glándula adrenal ($P < 0.001$) respecto a los animales control cuando son sacrificados por

la mañana, en donde obtenemos un incremento en términos de corticosterona circulante de $45 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de plasma y en glándula de $42 \mu\text{g}/\text{g}$ de tejido.

En los animales sacrificados por la tarde, aún cuando los promedios obtenidos en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal son significativamente superiores a sus correspondientes animales control ($P < 0.001$ en plasma; $P < 0.05$ en glándula adrenal), los incrementos observados a esta hora del día son inferiores a los obtenidos en respuesta a la inmovilización aplicada por la mañana, siendo en este caso el incremento en los niveles de corticosterona en plasma de $14 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ y en glándula adrenal de $16 \mu\text{g}/\text{g}$ de tejido.

El promedio de los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal obtenidos después de la aplicación del "stress" no presentan diferencias significativas entre la mañana y la tarde (figura 1).

En respuesta a la inmovilización podemos ver en la Tabla V, un descenso significativo ($P < 0.001$) respecto de los animales control en la concentración de ácido ascórbico en glándula adrenal, tanto en los animales sacrificados por

la mañana como por la tarde.

En la Tabla VI, presentamos los promedios de los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y de catecolaminas en glándula adrenal, observando que la aplicación del "stress" no modifica los niveles de dopamina respecto de los controles a los dos tiempos del día estudiados, mientras que la concentración de noradrenalina en cerebro desciende significativamente respecto de los controles ($P < 0.02$ por la mañana; $P < 0.001$ por la tarde).

Vemos una respuesta distinta en función de la hora del día en que son sacrificadas las ratas en relación a la concentración de catecolaminas en glándula adrenal, descendiendo significativamente ($P < 0.01$) respecto a los controles en los animales sacrificados por la mañana y aumentando ($P < 0.001$) en los sacrificados por la tarde.

Si comparamos los promedios obtenidos en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal como consecuencia de la aplicación de la inmovilización entre la mañana y la tarde, vemos que por la tarde aumenta significativamente ($P < 0.001$) con un 67 por ciento de variación respecto a los animales sacrificados por la mañana (figura 2).

TABLA V

Niveles de corticosterona en plasma y de corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal de animales control y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Corticosterona		"p"	Acido ascórbico		"p"
	Plasma ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)		Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)		
<u>Mañana</u>						
Controles	8,5 \pm 2,44	21,3 \pm 4,42	< 0.001	5215 \pm 257	< 0.001	
Controles + Inmovilización	53,8 \pm 3,51	62,9 \pm 3,09		2742 \pm 104		
<u>Tarde</u>						
Controles	30,7 \pm 1,34	48,5 \pm 4,00	< 0.001	5048 \pm 212	< 0.001	
Controles + Inmovilización	45,1 \pm 2,43	64,3 \pm 4,20		3001 \pm 182		

Promedios \pm E.S. de 6-12 animales

TABLA VI

Niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y de catecolaminas en glándula adrenal de animales control y sometidos a INMOVILIZACIÓN, sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Cerebro		Glándula adrenal	
	Dopamina (ng/g)	"p" "	Noradrenalina (ng/g)	"p" "
<u>Mañana</u>				
Controles	1011 ± 21	ns	427 ± 14	< 0.02
Controles + Inmovilización	1026 ± 72		1268 ± 128	< 0.01
<u>Tarde</u>				
Controles	1089 ± 43	ns	455 ± 13	< 0.001
Controles + Inmovilización	1151 ± 51		882 ± 55	< 0.001
			1581 ± 101	

Promedios ± E.S. de 6-12 animales.

ADMINISTRACION DE FENOBARBITAL Y RESPUESTA A LA INMOVILIZACION

Una vez comprobado que bajo nuestras condiciones experimentales a los dos tiempos del día en que eran sacrificados los animales, se producían las diferencias expuestas en los niveles de corticosterona adrenal y plasmática debidas a la existencia del ritmo circadiano, así como que el "stress" de inmovilización a que eran sometidos los animales inducía aumentos significativos en los niveles de esta hormona, procedimos al estudio del efecto que la administración de una dosis subanestésica de 50 mg/kg de fenobarbital durante ocho días consecutivos podía tener sobre los parámetros de nuestra investigación, en animales sacrificados a los dos horas del día indicadas, así como la respuesta a la inmovilización en ratas previamente tratadas con el barbitúrico.

El tratamiento crónico con fenobarbital no modifica los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal a ninguna de las dos horas del día estudiadas respecto de los correspondientes animales control (Tabla VII, figuras 3-8). Respecto a las variaciones de dopamina y noradrenalina en cerebro (Tabla VIII), solamente observamos un descenso significativo ($P < 0.001$)

en la concentración de noradrenalina en cerebro en animales sacrificados por la tarde respecto a sus correspondientes controles(fig. 14).

Al comparar los resultados obtenidos después de la administración crónica de fenobarbital de animales sacrificados por la mañana con los de la tarde, podemos observar que a esta última hora del día se producen aumentos significativos en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal ($P < 0.01$) donde vemos en la figura 1 una variación de un 134,4 y un 104,4 por ciento respectivamente. También observamos descensos en la concentración de ácido ascórbico ($P < 0,02$) (figura 1) y en los niveles de catecolaminas en la glándula adrenal ($P < 0.01$) con un 45,9 por ciento de variación (figura 2), respecto de los animales sacrificados por la mañana.

La inmovilización, en animales tratados durante ocho días consecutivos con fenobarbital, no modifica a excepción de la dopamina, ninguno de los parámetros estudiados a las dos horas del día en que se lleva a cabo el sacrificio, al comparar los resultados con los obtenidos en los correspondientes animales control -ratas inyectadas durante ocho

TABLA VII

Efecto de la administración de FENOBARBITAL (50 mg/kg/día) durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Corticosterona			Acido ascórbico	
	Plasma (μ g/100 ml)	"p"	Glándula adrenal (μ g/g)	Glándula adrenal (μ g/g)	"p"
<u>Mañana</u>					
Controles	8,5 \pm 2,44	ns	21,3 \pm 4,42	5215 \pm 257	ns
Fenobarbital	12,5 \pm 3,55		20,4 \pm 5,24	5533 \pm 140	
<u>Tarde</u>					
Controles	30,7 \pm 1,34	ns	48,5 \pm 4,00	5048 \pm 212	ns
Fenobarbital	29,3 \pm 1,97		41,7 \pm 1,99	4980 \pm 139	

Promedios \pm E.S. de 6-8 animales.

TABLA VIII

Efecto de la administración de FENOBARBITAL (50 mg/kg/día) durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y catecolaminas en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Cerebro		Glándula adrenal	
	Dopamina (ng/g)	"p"	Noradrenalina (ng/g)	"p"
<u>Mañana</u>				
Controles	1011 ± 21		427 ± 14	
Fenobarbital	975 ± 31	ns	410 ± 14	ns
			1268 ± 128	
			1400 ± 147	
<u>Tarde</u>				
Controles	1089 ± 43		455 ± 13	
Fenobarbital	1001 ± 60	ns	379 ± 11	< 0.001
			882 ± 55	ns
			758 ± 42	

Promedios ± E.S. de 6-8 animales.

TABLA IX

Efecto de la INMOVILIZACION en animales control y en animales tratados previamente con 50 mg/kg/día de FENOBARBITAL durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de corticosterona en plasma y corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Corticosterona			Acido ascórbico	
	Plasma (μ g/100 ml)	"P"	Glándula adrenal (μ g/g)	Glándula adrenal (μ g/g)	"P"
<u>Mañana</u>					
Controles + Inmovilización	53,8 \pm 3,51		62,9 \pm 3,09	2742 \pm 104	
Fenobarbital + Inmovilización	60,3 \pm 4,18	ns	67,5 \pm 2,51	2788 \pm 163	ns
<u>Tarde</u>					
Controles + Inmovilización	45,1 \pm 2,43		64,3 \pm 4,20	3001 \pm 182	
Fenobarbital + Inmovilización	49,4 \pm 2,40	ns	54,0 \pm 3,41	3007 \pm 138	ns

Promedios \pm E.S. de 7-8 animales.

TABLA X

Efecto de la INMOVILIZACION en animales control y en animales tratados previamente con 50 mg/kg/día de FENOBARBITAL durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y catecolaminas en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Cerebro		Glándula adrenal	
	Dopamina (ng/g)	"p"	Noradrenalina (ng/g)	"p"
<u>Mañana</u>				
Controles + Inmovilización	1026 ± 72		380 ± 11	
Fenobarbital + Inmovilización	983 ± 44	ns	392 ± 15	ns
			948 ± 20	
			1025 ± 62	
<u>Tarde</u>				
Controles + Inmovilización	1151 ± 51		371 ± 12	
Fenobarbital + Inmovilización	832 ± 31	< 0.001	353 ± 8	ns
			1581 ± 101	
			1390 ± 139	

Promedios ± E.S. de 7-8 animales.

días con el vehículo y sometidas el último día a inmovilización- (Tablas IX y X, figuras 3-14); la concentración de dopamina en cerebro, desciende significativamente ($P < 0.001$) respecto de sus controles en los animales sacrificados por la tarde (Tabla X y figura 12).

Observamos niveles significativamente inferiores de corticosterona en plasma ($P < 0.05$) y en glándula adrenal ($P < 0.01$) así como en la concentración de dopamina ($P < 0.02$) y noradrenalina en cerebro ($P < 0.05$) al comparar los resultados obtenidos en los animales previamente tratados con fenobarbital e inmovilizados y sacrificados por la tarde frente a los promedios obtenidos en los animales bajo las mismas condiciones pero sacrificados por la mañana (figuras 1 y 2); sin embargo vemos respecto a la concentración de adrenalina en la glándula adrenal, un aumento significativo ($P < 0.05$), si comparamos los valores obtenidos en los animales sacrificados por la tarde respecto de los hallados por la mañana (figura 2).

ADMINISTRACION CRONICA DE DIFENILHIDANTOINA Y RESPUESTA A LA INMOVILIZACION

La administración de 60 mg/kg/día de difenilhidan-

toína durante ocho días consecutivos, induce en los animales sacrificados por la mañana incrementos significativos en los niveles de corticosterona en plasma ($P < 0.001$) y en glándula adrenal ($P < 0.001$) comparando los resultados con sus correspondientes animales control (Tabla XI, figuras 3 y 5). A esta misma hora del día, observamos un descenso en la concentración de ácido ascórbico en glándula adrenal ($P < 0.02$) que es mucho más pronunciado ($P < 0.001$) en los animales sacrificados por la tarde (figuras 7 y 8). No hallamos que este fármaco induzca modificaciones en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal cuando los animales son sacrificados por la tarde (figuras 4 y 5).

Respecto a los niveles de catecolaminas en cerebro (Tabla XII, figuras 11-14) encontramos descensos significativos en los niveles de dopamina tanto por la mañana ($P < 0.01$) como por la tarde ($P < 0.02$) respecto de los animales control, así como un descenso ($P < 0.05$) en los niveles de noradrenalina en cerebro cuando los animales son sacrificados por la tarde. La concentración adrenal de catecolaminas (Tabla XII, figuras 9 y 10) presenta un aumento ($P < 0.05$) en los animales sacrificados por la tarde respecto a sus controles.

Si comparamos los resultados obtenidos en los animales tratados con difenilhidantoína y sacrificados por la tarde, frente a los obtenidos en animales sacrificados por la mañana y sometidos al mismo tratamiento (figuras 1 y 2), observamos unos niveles significativamente inferiores de catecolaminas en glándula adrenal ($P < 0.001$) así como de ácido ascórbico ($P < 0.01$) en los animales sacrificados por la tarde; no encontramos diferencias entre mañana y tarde en los niveles de corticosterona en plasma, en la glándula adrenal y en la concentración de dopamina y noradrenalina en cerebro.

En los animales tratados con difenilhidantoína y sometidos a inmovilización (Tabla XIII, figuras 3, 5 y 7), no observamos variaciones en los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal, de animales sacrificados por la mañana al comparar los resultados con los obtenidos en los correspondientes animales control; sin embargo en los animales sacrificados por la tarde, (figuras 4, 6 y 8), observamos descensos significativos frente a sus respectivos controles, en el contenido en glándula adrenal de corticosterona ($P < 0.01$) y ácido ascórbico ($P < 0.01$). También los niveles de estos dos paráme-

tros en los animales sometidos a inmovilización y sacrificados por la tarde son significativamente inferiores ($P < 0.01$ para la corticosterona en glándula adrenal y $P < 0.01$ para el ácido ascórbico adrenal) a los observados en los animales sometidos a la misma situación (inyectados con difenilhidantoína y sometidos a inmovilización pero sacrificados por la mañana) (figura 1).

En la Tabla XIV, se puede ver que como consecuencia de la inmovilización en animales tratados previamente con difenilhidantoína, se producen descensos significativos frente a sus respectivos controles en el contenido de noradrenalina en cerebro ($P < 0.05$ en los animales sacrificados por la mañana y $P < 0.02$ en los sacrificados por la tarde) así como en el contenido de dopamina ($P < 0.01$) exclusivamente en los animales sacrificados por la tarde (figuras 11-14).

En los animales sometidos a "stress", tratados previamente con difenilhidantoína y sacrificados por la mañana, el nivel de catecolaminas en la glándula adrenal es significativamente superior ($P < 0.001$) al obtenido en los animales control correspondientes (Tabla XIV y figura 9). El efecto contrario, es decir un descenso significativo ($P < 0.001$) del contenido de catecolaminas en glándula adrenal, respecto a los animales control correspondientes, ob-

TABLA XI

Efecto de la administración de DIFENILHIDANTOINA (60 mg/kg/día) durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de corticosterona en plasma y corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Corticosterona			Acido ascórbico	
	Plasma ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	"p"	Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)	"p"
<u>Mañana</u>					
Controles	8,5 + 2,44	<0.001	21,3 + 4,42	5215 + 257	<0.02
Difenilhidantoína	29,3 + 3,15		44,9 + 2,63	4552 + 61	
<u>Tarde</u>					
Controles	30,7 + 1,34	ns	48,5 + 4,00	5048 + 212	<0.001
Difenilhidantoína	27,7 + 1,02		39,3 + 2,20	3504 + 147	

Promedios + E.S. de 6-8 animales.

TABLA XII

Efecto de la administración de DIFENILHIDANTOINA (60 mg/kg/día) durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y catecolaminas en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Cerebro		Glándula adrenal	
	Dopamina (ng/g)	"p"	Noradrenalina (ng/g)	Catecolaminas (µg/g)
<u>Mañana</u>				
Controles	1011 ± 21	<0.01	427 ± 14	1268 ± 128
Difenilhidantoína	907 ± 23		407 ± 14	1482 ± 78
				ns
<u>Tarde</u>				
Controles	1089 ± 43	<0.02	455 ± 13	882 ± 55
Difenilhidantoína	938 ± 36		410 ± 15	1081 ± 70
				<0.05

Promedios ± E.S. de 6-8 animales.

TABLA XIII

Efecto de la INMOVILIZACION en animales control y en animales tratados previamente con 60 mg/kg/día de DIFENILHIDANTOINA durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de corticosterona en plasma y corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Corticosterona			Acido ascórbico	
	Plasma ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	"p"	Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)	"p"
<u>Mañana</u>					
Controles + Inmovilización	53,8 \pm 3,51		62,9 \pm 3,09	2742 \pm 104	
Difenilhidantoína + Inmovilización	46,3 \pm 2,24	ns	61,8 \pm 2,98	2840 \pm 174	ns
<u>Tarde</u>					
Controles + Inmovilización	45,1 \pm 2,43		64,3 \pm 4,20	3001 \pm 182	
Difenilhidantoína + Inmovilización	43,0 \pm 2,18	ns	46,3 \pm 3,25	2162 \pm 114	< 0.01

Promedios \pm E.S. de 7-10 animales.

TABLA XIV

Efecto de la INMOVILIZACION en animales control y en animales tratados previamente con 60 mg/kg/día de DIFENILHIDANTOINA durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y catecolaminas en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Cerebro		Glándula adrenal	
	Dopamina (ng/g)	"p" "	Noradrenalina (ng/g)	"p" "
<u>Mañana</u>				
Controles + Inmovilización	1026 ± 72	ns	380 ± 11	948 ± 20
Difenilhidantoína + Inmovilización	955 ± 37		343 ± 13	1386 ± 41
				<0.001
<u>Tarde</u>				
Controles + Inmovilización	1151 ± 51	<0.01	371 ± 12	1581 ± 101
Difenilhidantoína + Inmovilización	857 ± 67		328 ± 9	845 ± 74
				<0.001

Promedios ± E.S. de 7-10 animales.

servamos en los animales bajo las mismas condiciones experimentales pero sacrificados por la tarde (Tabla XIV y figura 10).

Obtenemos descensos significativos ($P < 0.001$) en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal, al comparar los resultados obtenidos en los animales inmovilizados previamente tratados durante ocho días con difenilhidantoína y sacrificados por la tarde con los promedios obtenidos en los animales bajo las mismas condiciones y sacrificados por la mañana (figura 2).

ADMINISTRACION CONJUNTA DE FENOBARBITAL Y DIFENILHIDANTOINA Y RESPUESTA A LA INMOVILIZACION

Una vez conocido el efecto que el tratamiento crónico individual con fenobarbital y con difenilhidantoína tienen sobre los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona, ácido ascórbico y catecolaminas en glándula adrenal y dopamina y noradrenalina en cerebro, estudiamos seguidamente el efecto de la administración de ambos fármacos, así como la respuesta a la inmovilización en animales previamente tratados con la mezcla de estos compuestos.

En la Tabla XV, podemos observar en los animales sacrificados por la mañana un incremento significativo ($P < 0.05$) en el nivel de corticosterona circulante (figura 3), no encontrando variaciones en el contenido en glándula adrenal de corticosterona (figura 5) y ácido ascórbico (figura 7).

En los animales sacrificados por la tarde y también tratados crónicamente durante ocho días consecutivos con fenobarbital mas difenilhidantoína (Tabla XV), observamos descensos significativos ($P < 0.001$) en los niveles de corticosterona en plasma ($P < 0.001$) (figura 4) y en glándula adrenal ($P < 0.001$) (figura 6) respecto de sus controles correspondientes.

En cuanto a las variaciones obtenidas en los niveles de catecolaminas en glándula adrenal y en cerebro (Tabla XVI), observamos un aumento significativo en la concentración de catecolaminas en glándula adrenal ($P < 0.05$) en los animales sometidos a la administración crónica con ambos fármacos y sacrificados por la tarde, (figura 10), al comparar los resultados con los correspondientes promedios obtenidos en los animales control; no observamos diferencias

a esta hora del día en el contenido de dopamina y noradrenalina en cerebro (figuras 12 y 14). Tampoco observamos variaciones en los animales sometidos a la administración crónica con ambos fármacos y sacrificados por la mañana en lo que respecta a la concentración de dopamina y noradrenalina en cerebro (figuras 11 y 13) y catecolaminas en glándula adrenal (figura 9).

Si comparamos los resultados obtenidos en los animales tratados con ambos fármacos y sacrificados por la tarde con los correspondientes animales también sometidos a dicho tratamiento pero sacrificados por la mañana, podemos ver (figura 1) que el contenido en glándula adrenal de corticosterona y ácido ascórbico aumenta significativamente ($P < 0.001$ y $P < 0.05$ respectivamente) en los animales sacrificados por la tarde.

En las Tablas XVII y XVIII presentamos los resultados de los promedios obtenidos en los parámetros de nuestro estudio en los animales sometidos a inmovilización, tratados previamente durante ocho días consecutivos con fenobarbital mas difenilhidantoína. Al comparar estos resultados con los obtenidos en los correspondientes animales control

sometidos a "stress" y sacrificados por la mañana, vemos no existen variaciones en ninguno de los parámetros estudiados (figuras 3, 5, 7, 9, 11 y 13).

En los animales tratados crónicamente con fenobarbital más difenilhidantoína, sometidos a inmovilización y sacrificados por la tarde, observamos aumentos significativos ($P < 0.01$) en el nivel de corticosterona en plasma, al comparar los resultados con los respectivos animales control (figura 4); sin embargo no encontramos variaciones en los otros parámetros de nuestro estudio (figuras 6, 8 10, 12 y 14).

Comparando los promedios obtenidos en los niveles de catecolaminas en glándula adrenal como consecuencia de la aplicación de la inmovilización en animales tratados crónicamente con fenobarbital más difenilhidantoína entre la mañana y la tarde (figura 2), observamos que a esta última hora del día aumenta significativamente ($P < 0.01$) respecto al obtenido en los animales sacrificados por la mañana y no hallamos variaciones en ninguno de los otros parámetros estudiados entre las dos horas del día.

TABLA XV

Efecto de la administración conjunta de FENOBARBITAL (50 mg/kg/día) y DIFENILHIDANTOINA (60 mg/kg/día) durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de corticosterona en plasma y corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Corticosterona		Acido ascórbico	
	Plasma ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Glándula adrenal ($\mu\text{g}/\text{g}$)	
<u>Mañana</u>	"p"	"p"	"p"	"p"
Controles	8,5 \pm 2,44	21,3 \pm 4,42	5215 \pm 257	ns
Fenobarbital + Difenilhidantoína	15,5 \pm 1,46	25,6 \pm 1,25	4939 \pm 80	
<u>Tarde</u>				
Controles	30,7 \pm 1,34	48,5 \pm 4,00	5048 \pm 212	ns
Fenobarbital + Difenilhidantoína	17,0 \pm 0,57	34,4 \pm 1,26	5233 \pm 85	

Promedios \pm E.S. de 6-16 animales.

TABLA XVI

Efecto de la administración conjunta de FENOBARBITAL (50 mg/kg/día) y DIFENILHIDANTOINA (60 mg/kg/día) durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y catecolaminas en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Cerebro		Glándula adrenal	
	Dopamina (ng/g)	"p" "p"	Noradrenalina (ng/g)	Catecolaminas (µg/g)
<u>Mañana</u>				
Controles	1011 ± 21	ns	427 ± 14	1268 ± 128
Fenobarbital + Difenilhidantoína	1114 ± 48		433 ± 13	1349 ± 88
				ns
<u>Tarde</u>				
Controles	1089 ± 43	ns	455 ± 13	882 ± 55
Fenobarbital + Difenilhidantoína	1151 ± 42		481 ± 13	1175 ± 81
				< 0.05

Promedios ± E.S. de 6-16 animales.

TABLA XVII

Efecto de la INMOVILIZACION en animales control y en animales tratados previamente con 50 mg/kg/día de FENOBARBITAL y 60 mg/kg/día de DIFENILHIDANTOINA durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de corticosterona en plasma y corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Corticosterona		Acido ascórbico	
	Plasma (μ g/100 ml)	Glándula adrenal (μ g/g)	Glándula adrenal (μ g/g)	"p"
<u>Mañana</u>				
Controles + Inmovilización	53,8 \pm 3,51	62,9 \pm 3,09	2742 \pm 104	ns
Fenobarbital + Difenilhidantoína + Inmovilización	64,8 \pm 5,43	66,4 \pm 5,15	2933 \pm 106	
<u>Tarde</u>				
Controles + Inmovilización	45,1 \pm 2,43	64,3 \pm 4,20	3001 \pm 182	ns
Fenobarbital + Difenilhidantoína + Inmovilización	59,2 \pm 2,80	55,8 \pm 1,63	3002 \pm 131	

Promedios \pm E.S. de 7-10 animales.

TABLA XVIII

Efecto de la INMOVILIZACION en animales control y en animales tratados previamente con 50 mg/kg/día de FENOBARBITAL y 60 mg/kg/día de DIFENILHIDANTOINA durante ocho días consecutivos, sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro y catecolaminas en glándula adrenal; animales sacrificados por la mañana o por la tarde.

	Cerebro		Glándula adrenal	
	Dopamina (ng/g)	"p"	Noradrenalina (ng/g)	"p"
<u>Mañana</u>				
Controles + Inmovilización	1026 ± 72	ns	380 ± 11	ns
Fenobarbital + Difenilhidantoína+ Inmovilización	1146 ± 49		367 ± 14	
			948 ± 20	ns
			1032 ± 46	
<u>Tarde</u>				
Controles + Inmovilización	1151 ± 51	ns	371 ± 12	ns
Fenobarbital + Difenilhidantoína+ Inmovilización	1057 ± 28		371 ± 7	
			1581 ± 101	ns
			1372 ± 74	

Promedios ± E.S. de 7-10 animales.

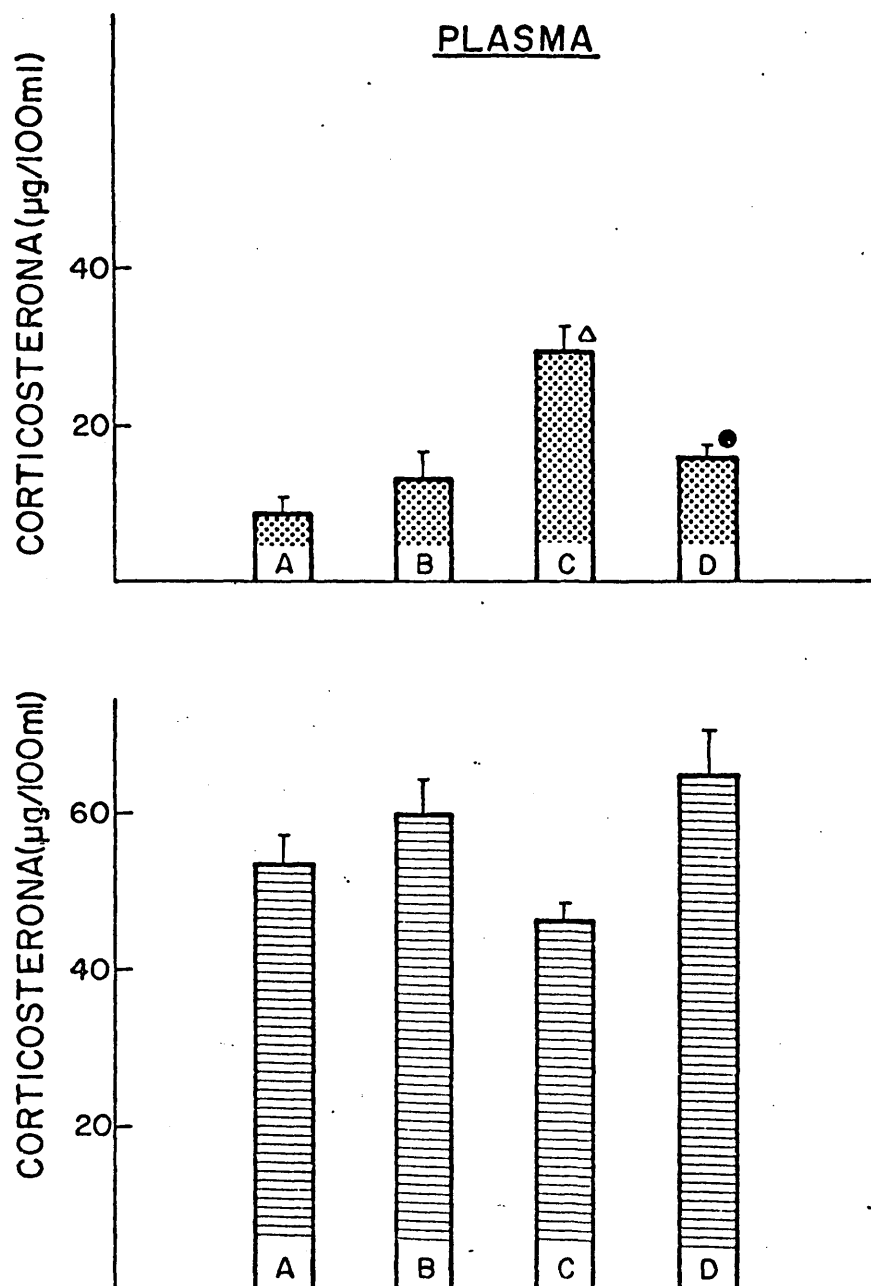


Figura 3

Niveles de corticosterona en plasma de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la mañana. Promedios \pm E.S.

A Controles; B Fenobarbital; C Difenilhidantoína;

D Fenobarbital + Difenilhidantoína.

Δ $P < 0.001$; \bullet $P < 0.05$ vs. Controles.

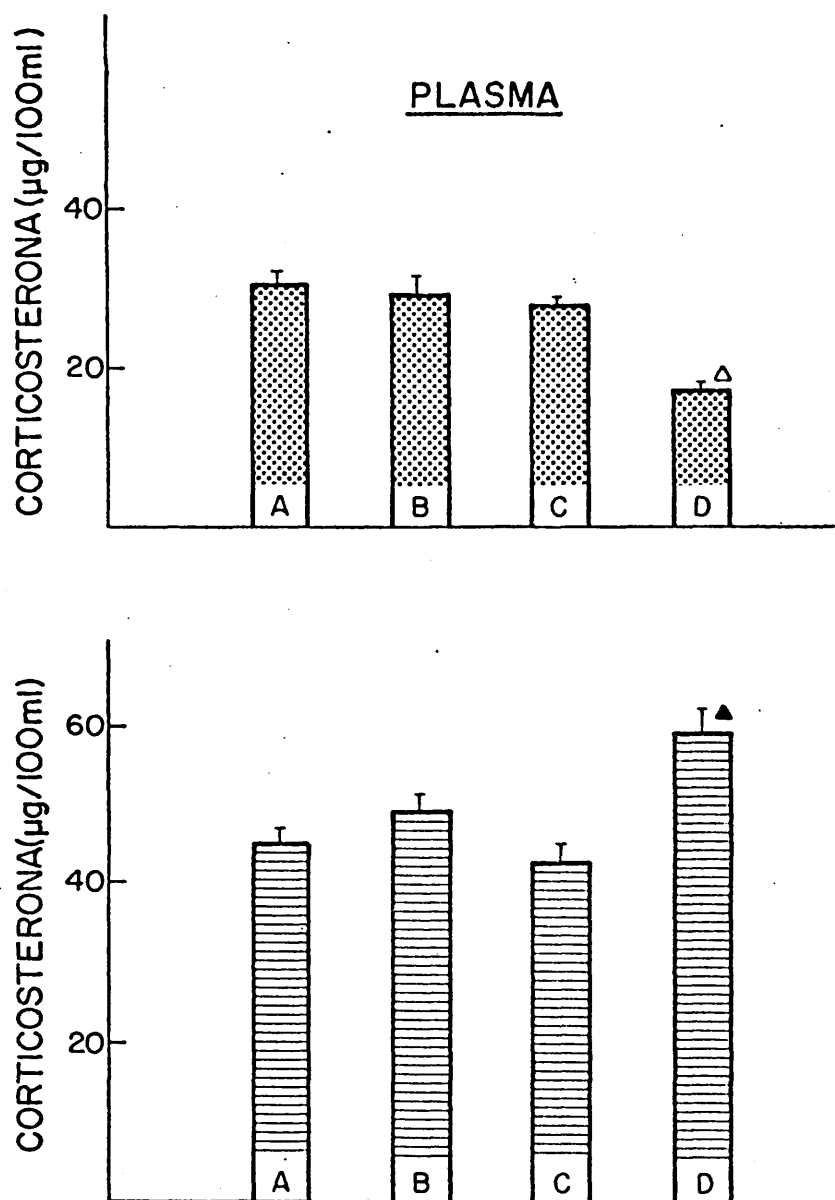


Figura 4

Niveles de corticosterona en plasma de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la tarde. Promedios \pm E.S.

[A] Controles; [B] Fenobarbital; [C] Difenilhidantoína;
[D] Fenobarbital + Difenilhidantoína.

^ΔP < 0.001; [▲]P < 0.01 vs. Controles.

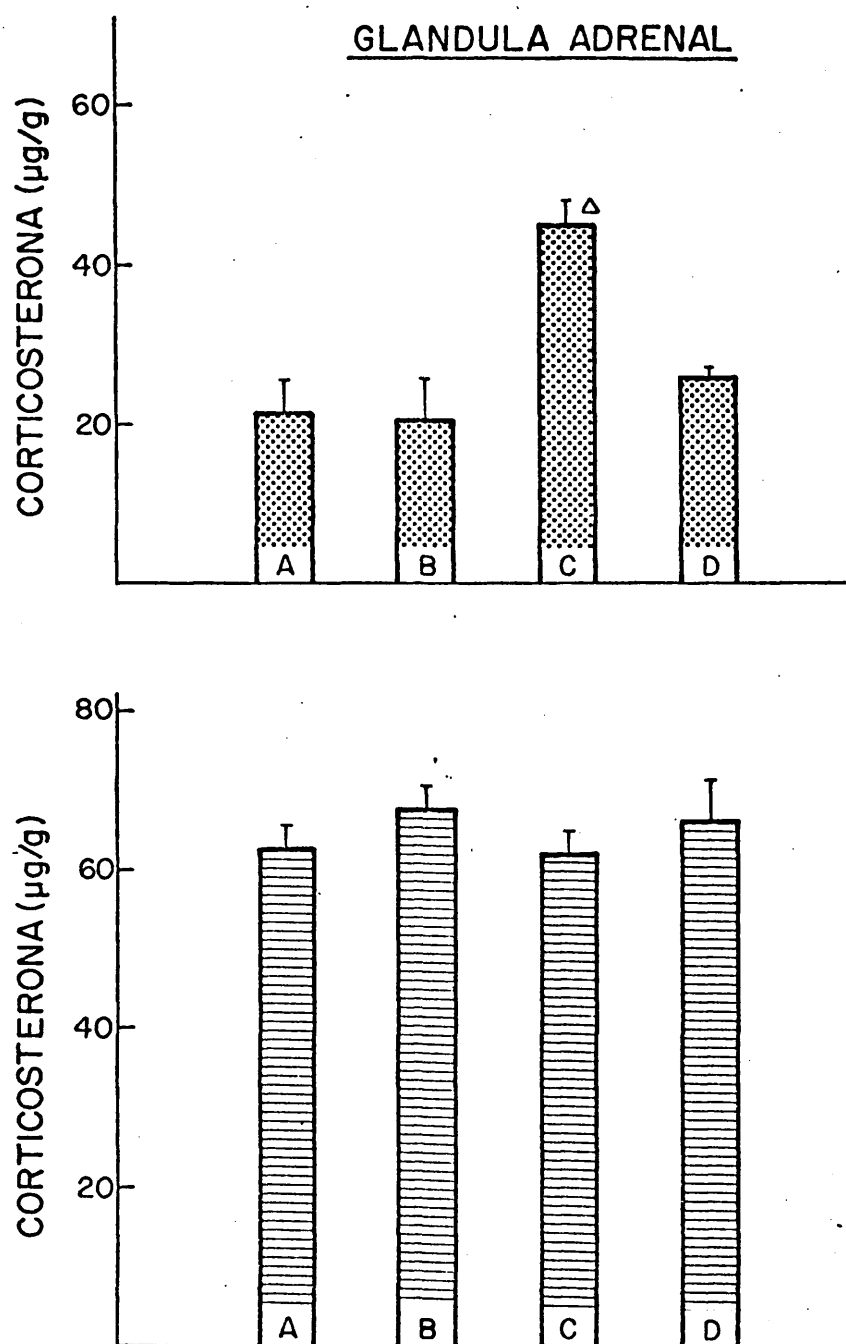


Figura 5

Niveles de corticosterona en glándula adrenal de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la mañana. Promedios \pm E.S.

A Controles; B Fenobarbital; C Difenilhidantoína;

D Fenobarbital + Difenilhidantoína.

^ΔP < 0.001 vs. Controles.

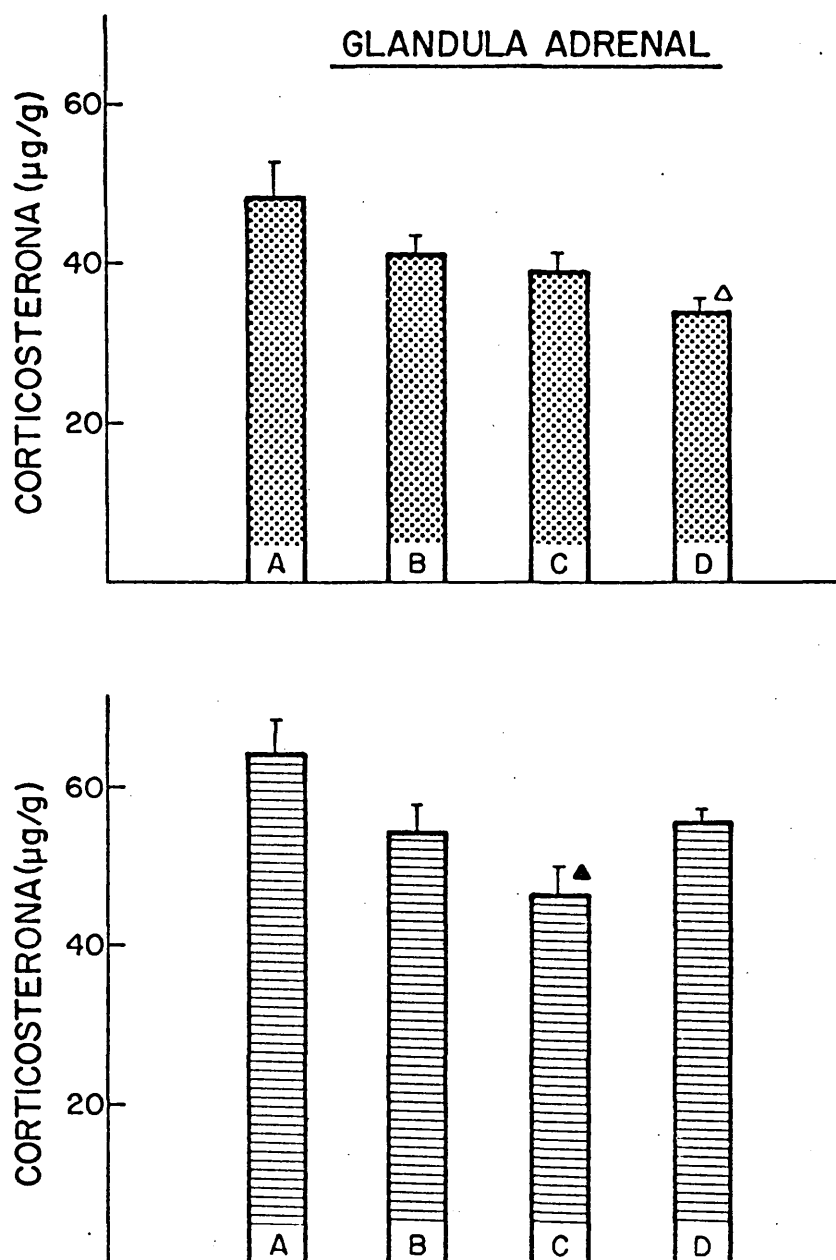


Figura 6

Niveles de corticosterona en glándula adrenal de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la tarde. Promedios \pm E.S.

Controles; Fenobarbital; Difenilhidantoína;
 Fenobarbital + Difenilhidantoína.

^ΔP < 0.001; [▲]P < 0.01 vs. Controles.

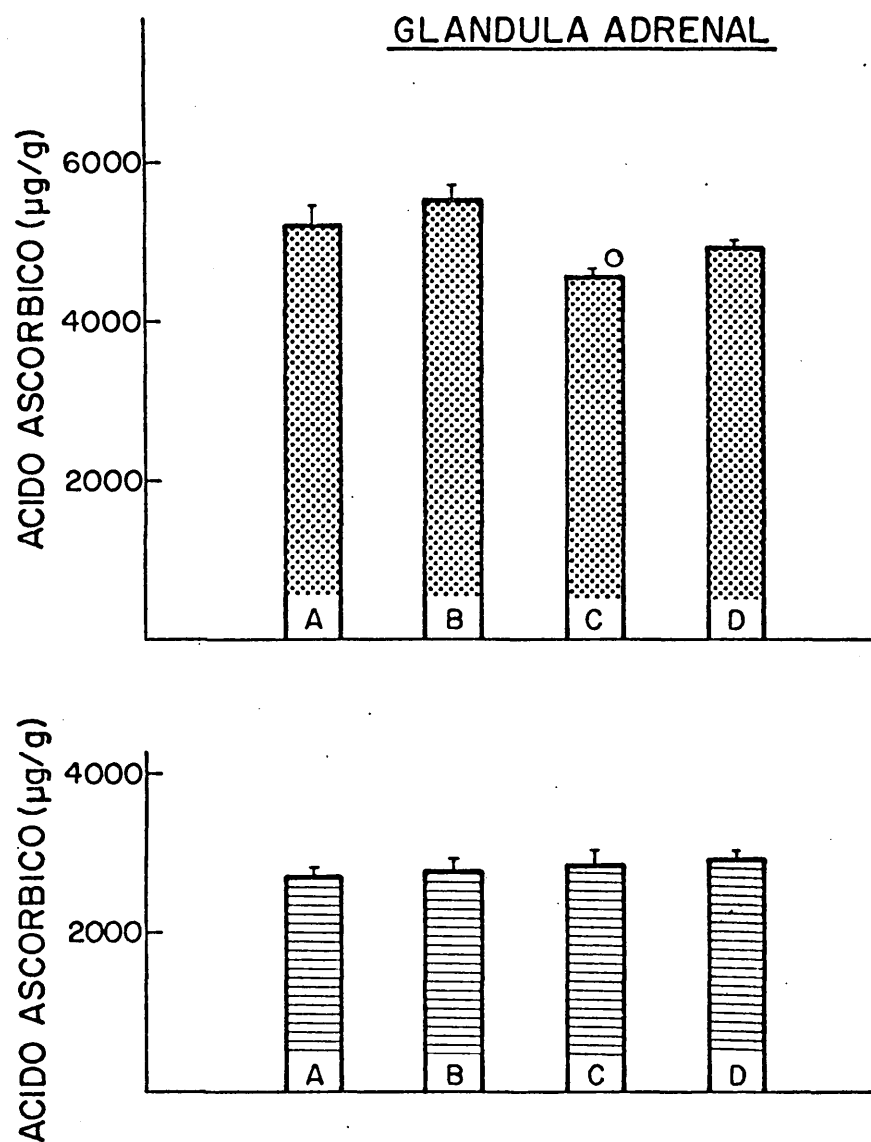


Figura 7

Niveles de ácido ascórbico en glándula adrenal de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la mañana. Promedios \pm E.S.

- [A] Controles; [B] Fenobarbital; [C] Difenilhidantoína;
 [D] Fenobarbital + Difenilhidantoína.

^oP < 0.02 vs. Controles.

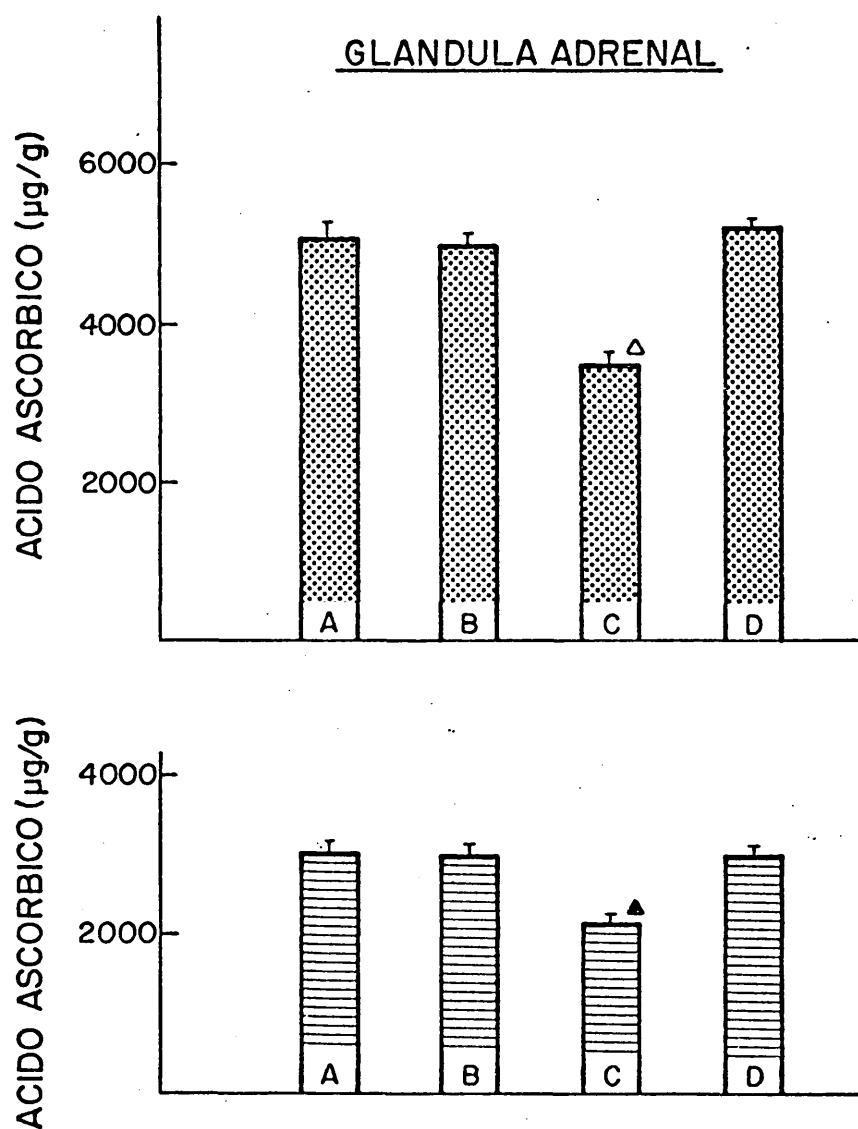


Figura 8

Niveles de ácido ascórbico en glándula adrenal de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la tarde. Promedios \pm E.S.

A Controles; B Fenobarbital; C Difenilhidantoína;
 D Fenobarbital + Difenilhidantoína.

^ΔP < 0.001; [▲]P < 0.01 vs. Controles.

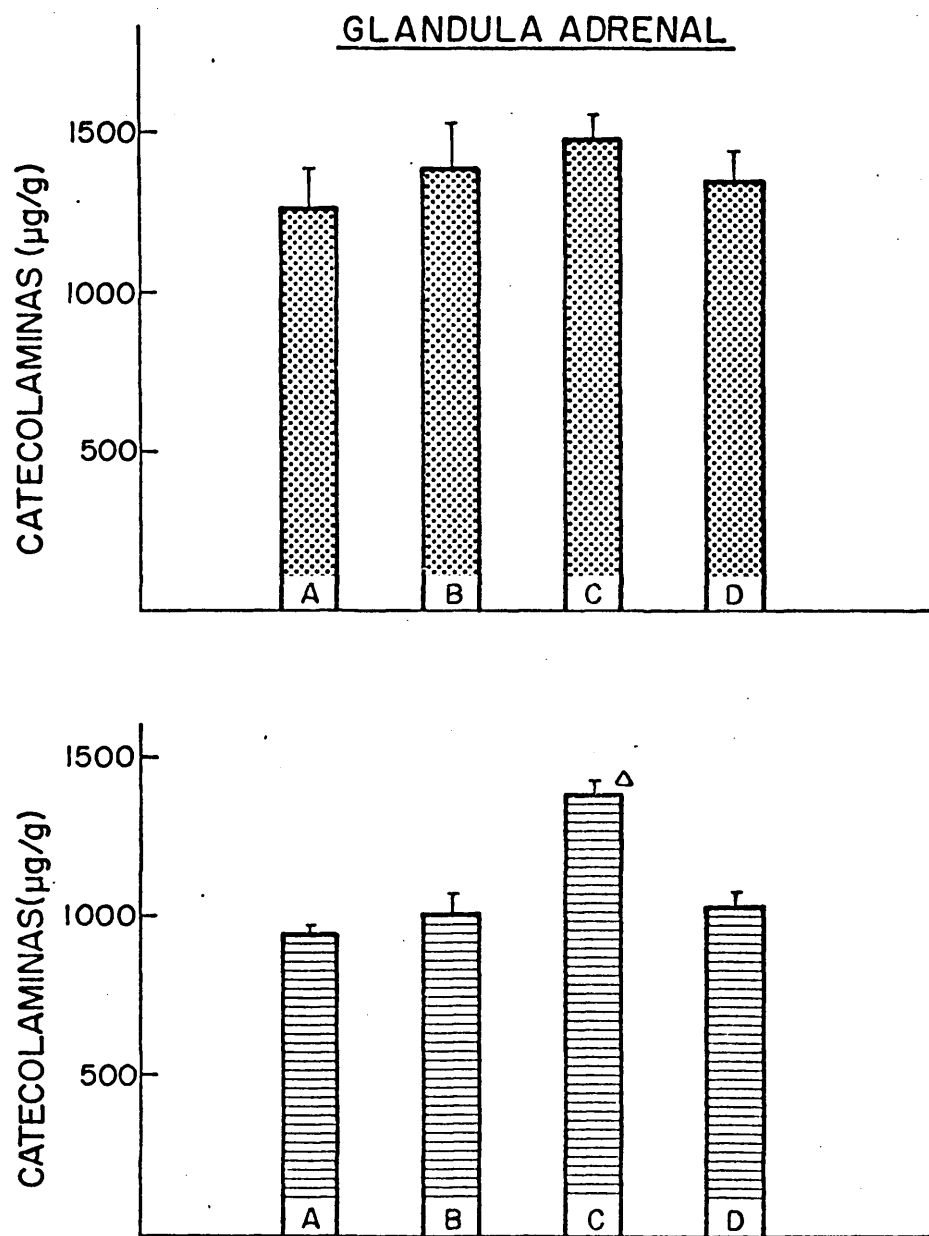


Figura 9

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la mañana. Promedios \pm E.S.

A Controles; B Fenobarbital; C Difenilhidantoína;

D Fenobarbital + Difenilhidantoína.

^ΔP < 0.001 vs. Controles.

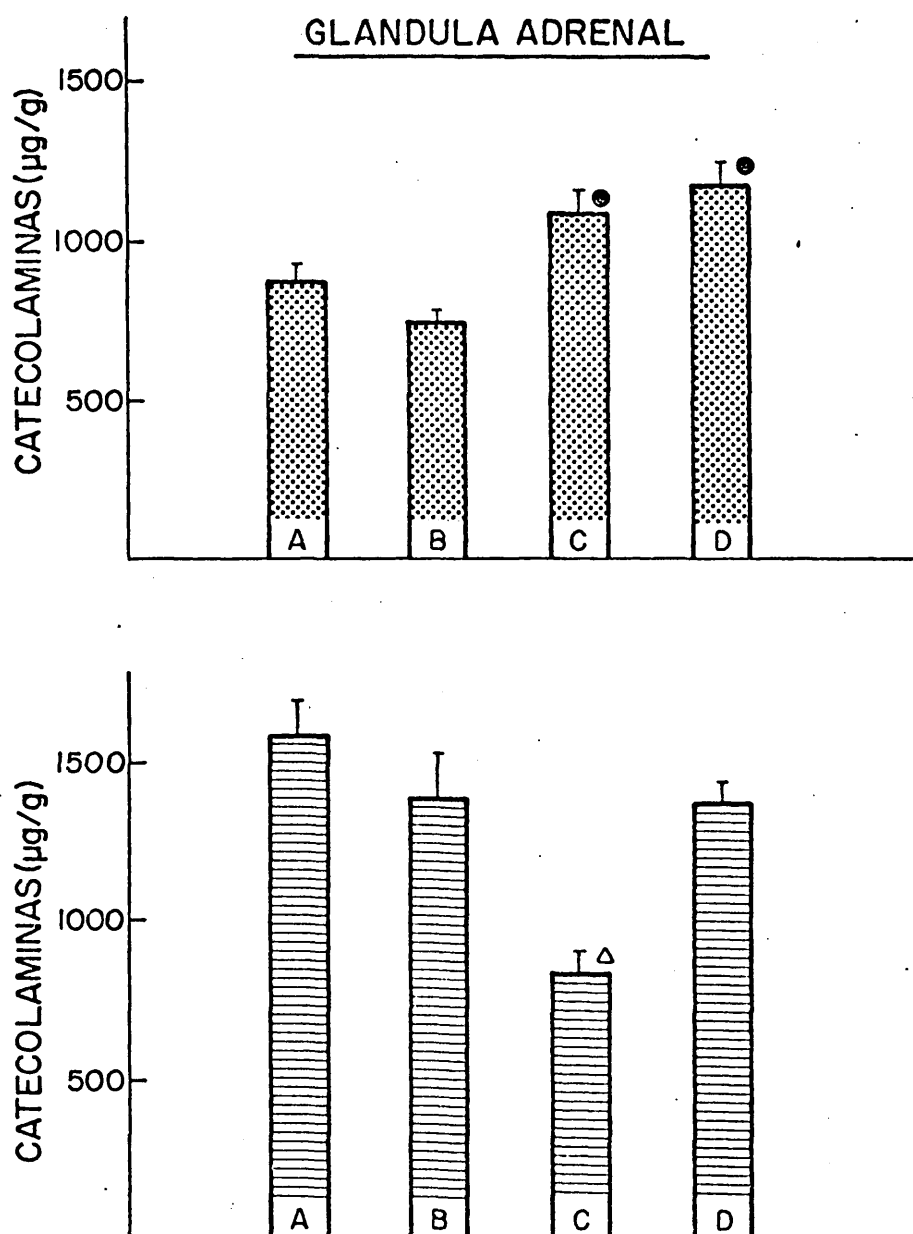


Figura 10

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la tarde. Promedios \pm E.S.

[A] Controles; **[B]** Fenobarbital; **[C]** Difenilhidantoína;
[D] Fenobarbital + Difenilhidantoína.

ΔP < 0.001; ● P < 0.05 vs. Controles.

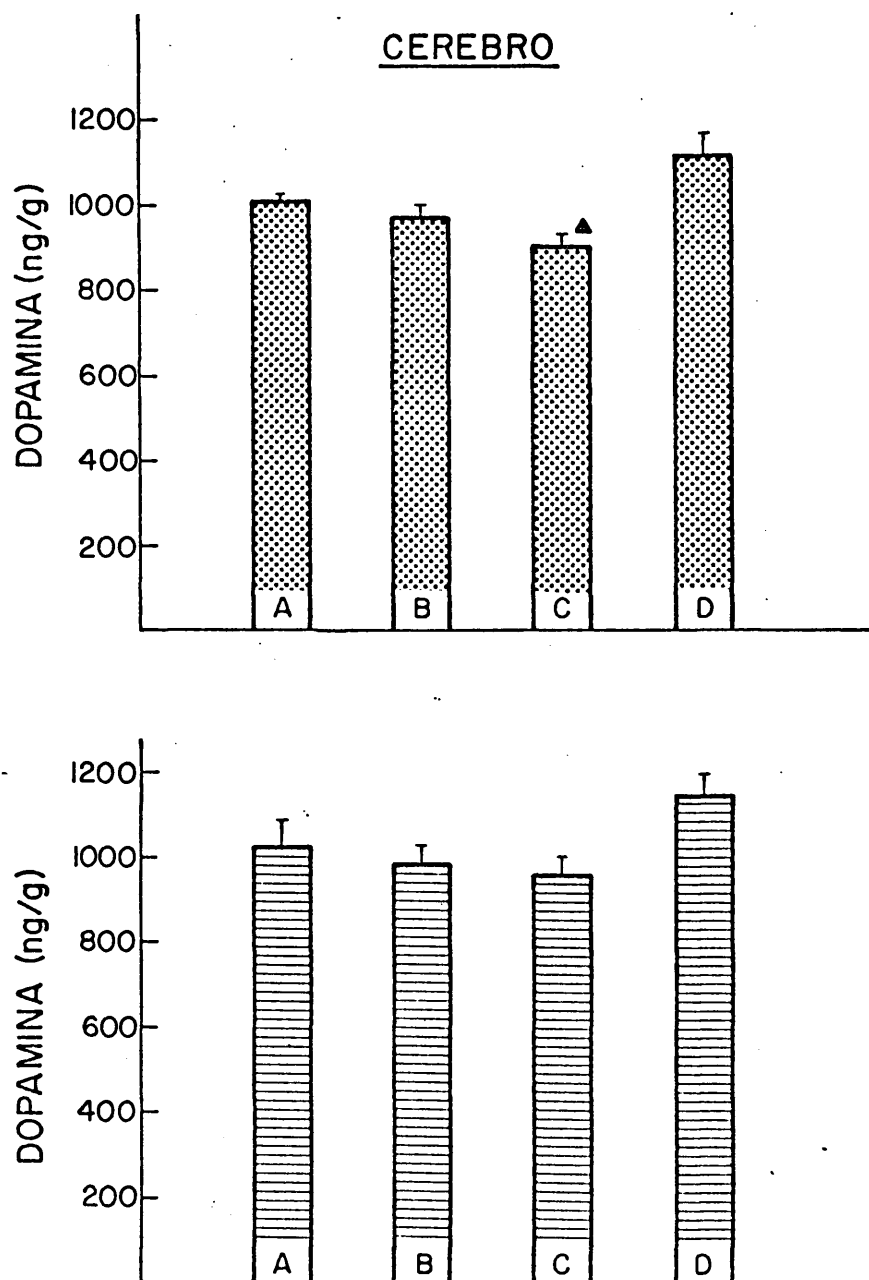


Figura 11

Niveles de dopamina en cerebro de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la mañana. Promedios ± E.S.

A Controles; B Fenobarbital; C Difenilhidantoína;

D Fenobarbital + Difenilhidantoína.

[▲]P < 0.01 vs. controles.

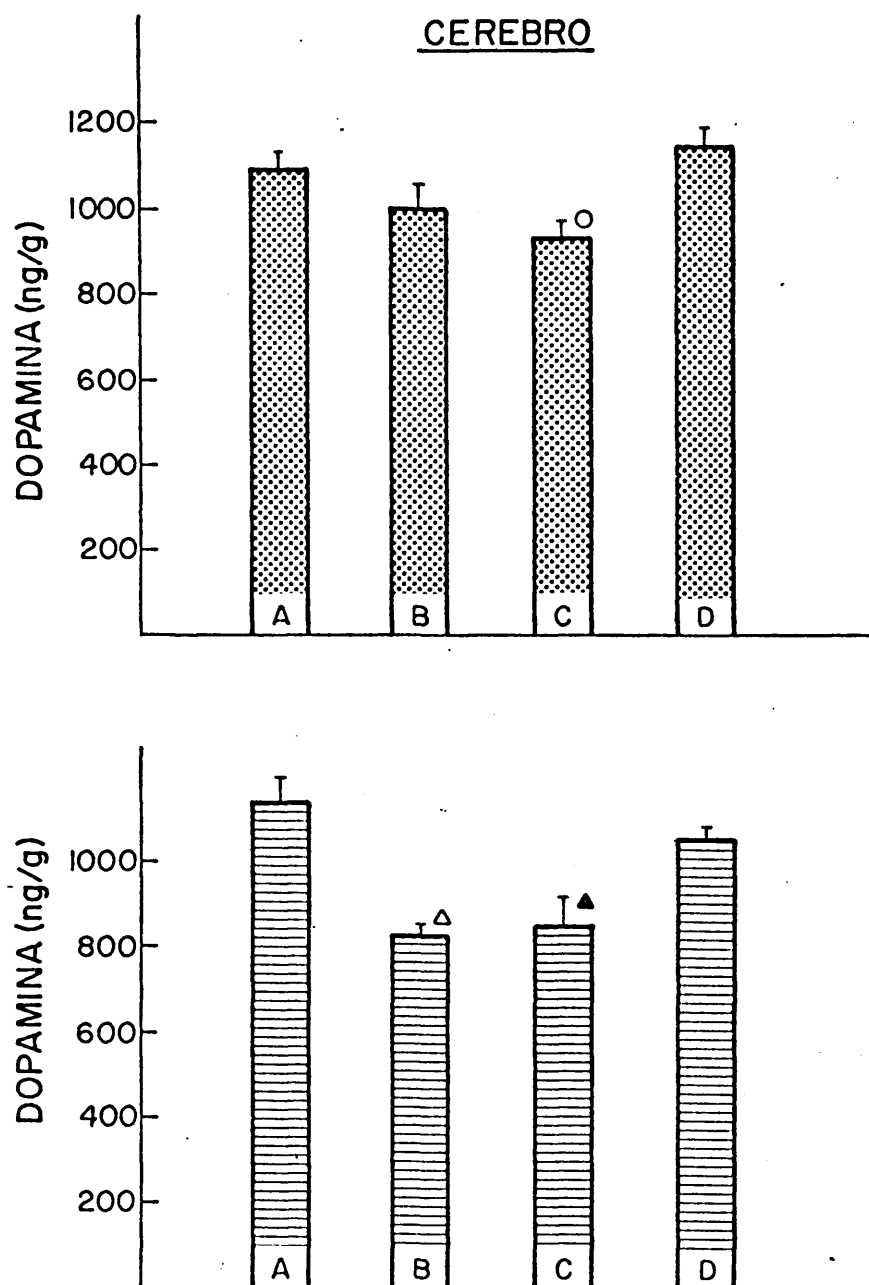


Figura 12

Niveles de dopamina en cerebro de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la tarde. Promedios \pm E.S.

A Controles; B Fenobarbital; C Difenilhidantoína;
 D Fenobarbital + Difenilhidantoína.

^ΔP < 0.001; [▲]P < 0.01; [○]P < 0.02 vs. Controles

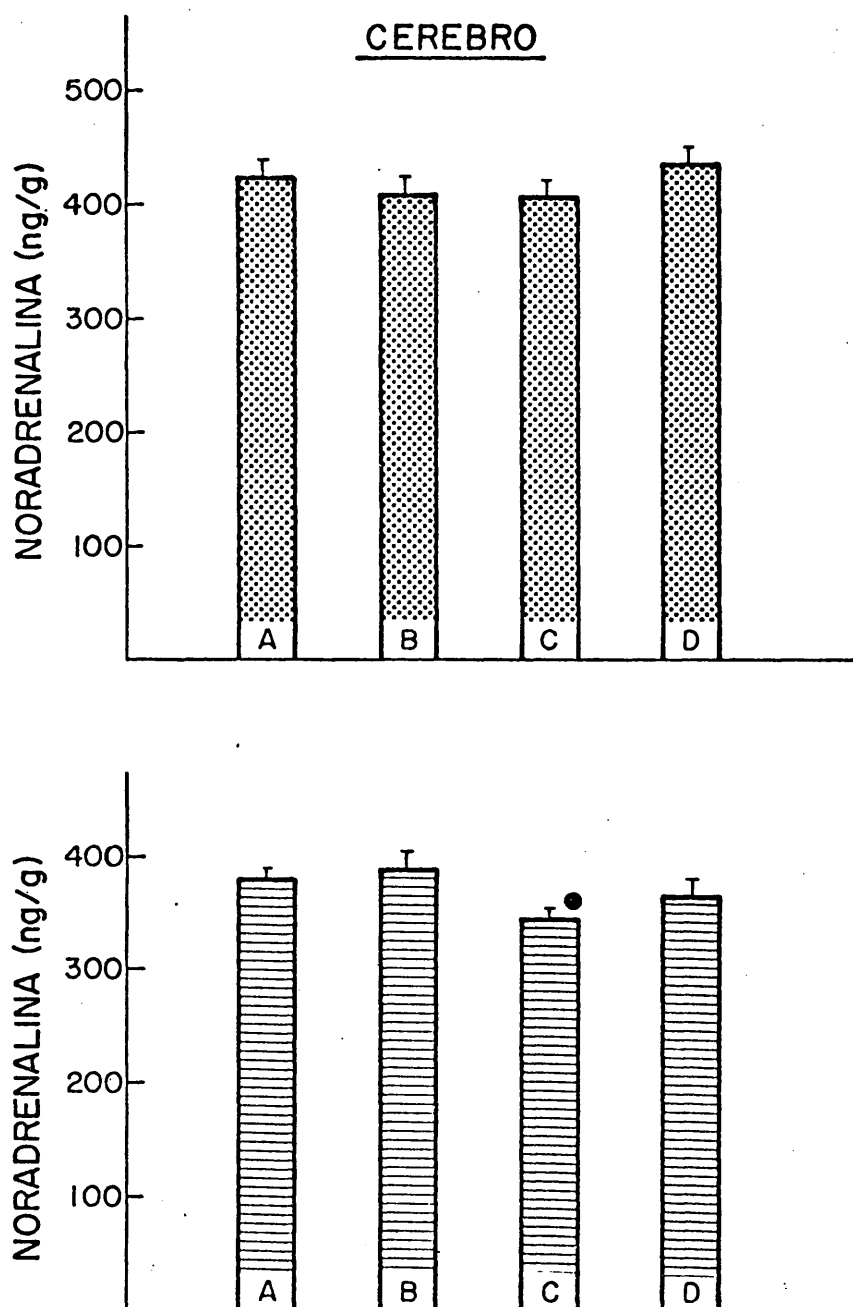


Figura 13

Niveles de noradrenalina en cerebro de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la mañana. Promedios \pm E.S.

A Controles; **B** Fenobarbital; **C** Difenilhidantoína;
D Fenobarbital + Difenilhidantoína.

• $P < 0.05$ vs. Controles.

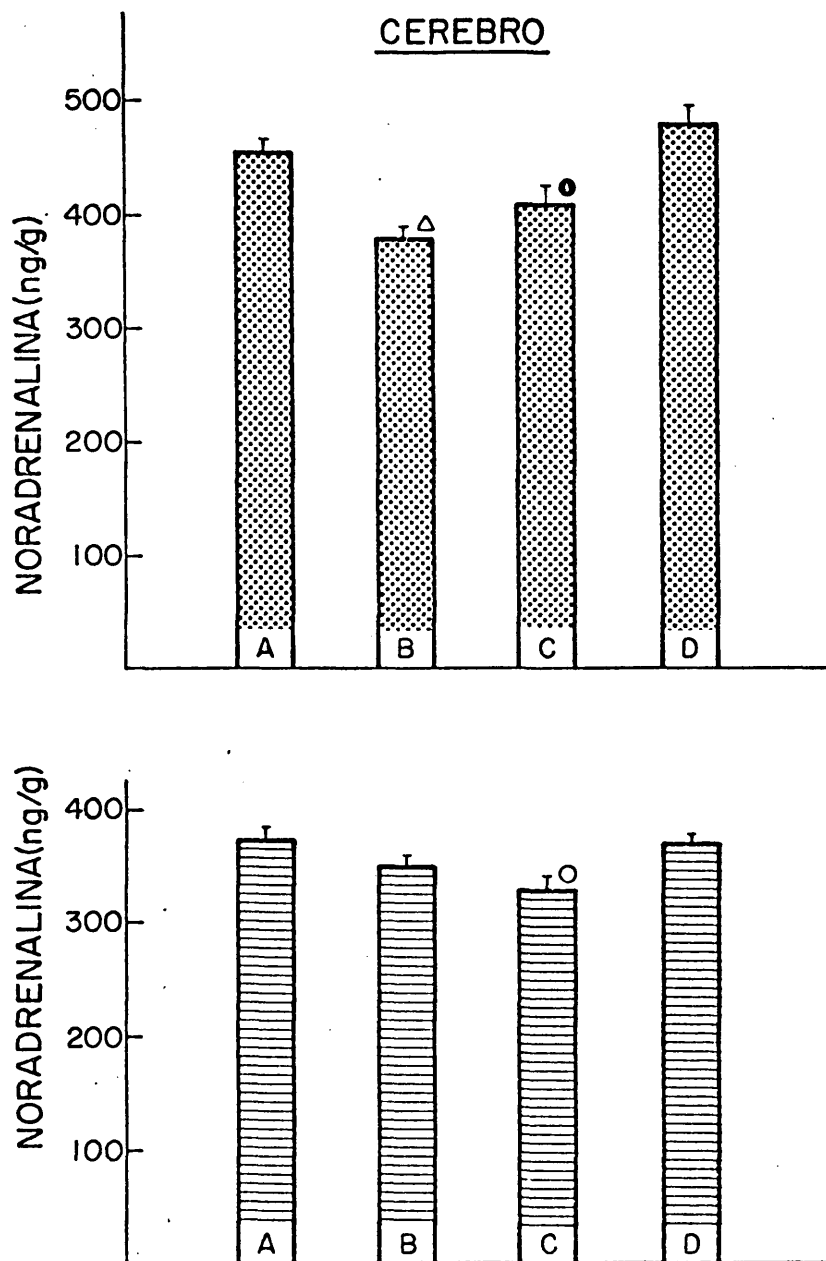


Figura 14

Niveles de noradrenalina en cerebro de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital y/o difenilhidantoína, sometidos o no a inmovilización y sacrificados por la tarde. Promedios \pm E.S.

[A] Controles; [B] Fenobarbital; [C] Difenilhidantoína;
[D] Fenobarbital + Difenilhidantoína.

Δ $P < 0.001$; ° $P < 0.02$; • $P < 0.05$ vs. Controles.

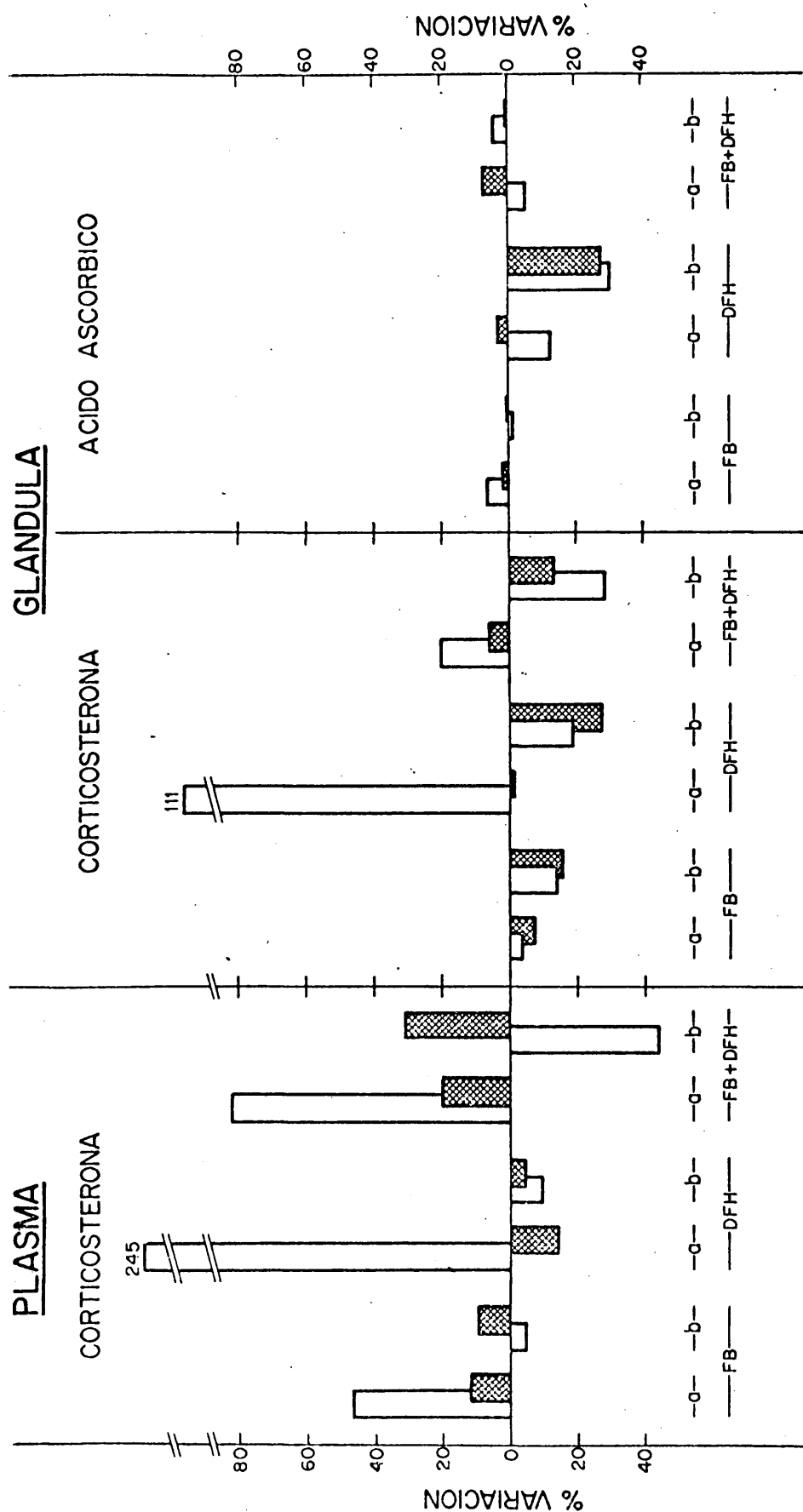


Figura 15

Variaciones en los niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital (FB) y/o difenilhidantoína (DFH), sacrificados por la mañana (-a-) o por la tarde (-b-) y sometidos a inmovilización. Resultados expresados en tanto por ciento de variación respecto a los correspondientes grupos de animales control.

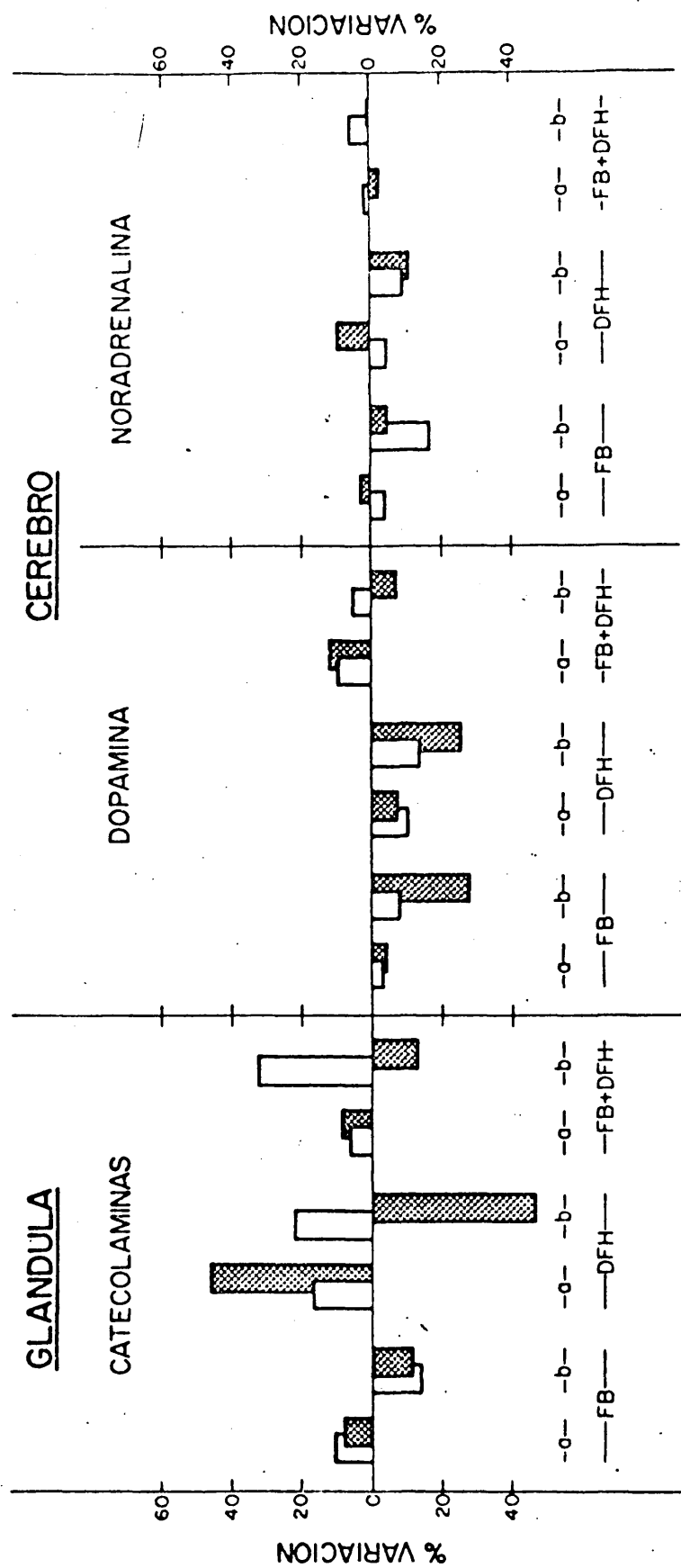


Figura 16

Variaciones en los niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro de animales tratados crónicamente (8 días) con fenobarbital (FB) y/o difenilhidantoína (DFH), sacrificados por la mañana (-a-) o por la tarde (-b-) y sometidos a o no a inmovilización. Resultados expresados en tanto por ciento de variación respecto a los correspondientes grupos de animales control.

Tabla 1

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales INTACTOS sacrificados por la MAÑANA.

Plasma		Glándula		
Corticosterona ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)		Corticosterona ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Acido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Peso (mg/par)
	9	14	4400	30
	6	35	5440	46
	4	18	5600	48
	3	44	5200	56
	7	16	5440	57
	18	34	5600	45
			4640	49
			4080	40
Pronedios	7,8	26,8	5050	46,4
\pm E.S.	\pm 2,21	\pm 5,08	\pm 210	\pm 3,06

Tabla 2

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales INTACTOS sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	987	927	463	1,54
	1859	818	442	1,64
	1544	1036	505	1,60
	1103	1145	358	1,44
	1040	818	400	1,59
	1418	1036	484	1,62
	1040	818	421	1,53
	1292			
Promedios	1285	943	439	1,56
\pm E.S.	\pm 108	\pm 50	\pm 19	\pm 0,026

Tabla 3

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales INTACTOS sacrificados por la TARDE.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/100 ml)</u>	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
	16	31	4160	41
	17	30	4160	45
	19	33	4080	40
	20	50	4400	59
	29	54	4160	47
	43	46	4800	57
	26	29	4000	52
	35	26	4640	53
	17	47	4880	54
	28	62	5120	55
	50	42	5760	50
Promedios	27,3	40,9	4560	50,3
\pm E.S.	\pm 3,42	\pm 3,58	\pm 164	\pm 1,90

Tabla 4

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales INTACTOS sacrificados por la TARDE.

	Glándula	Cerebro		
	Catecolaminas ($\mu\text{g/g}$)	Dopamina (ng/g)	Noradrenalina (ng/g)	Peso (g)
	928	975	520	1,57
	928	1125	520	1,76
	857	1125	560	1,56
	1000	1125	560	1,56
	1071	1125	480	1,64
	785	1125	520	1,70
	1071	1200	580	1,57
	928	1125	520	1,67
	848	847	400	1,36
	913	988	419	1,48
	804	988	438	1,32
Promedios	921	1068	502	1,56
\pm E.S.	\pm 29	\pm 25	\pm 18	\pm 0,041

Tabla 5

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales CONTROL sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>	
	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/100 ml)</u>	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
	3	15	5067	63
	8	15	4444	51
	17	32	4711	52
	2	6	5511	53
	7	32	6222	45
	14	28	5333	58
Promedios	8,5	21,3	5215	53,6
<u>±</u> E.S.	<u>±</u> 2,44	<u>±</u> 4,42	<u>±</u> 257	<u>±</u> 2,52

Tabla 6

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales CONTROL sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u>	<u>Dopamina</u>	<u>Noradrenalina</u>	<u>Peso</u>
	<u>(μg/g)</u>	<u>(ng/g)</u>	<u>(ng/g)</u>	<u>(g)</u>
	1049	933	418	1,60
	1195	1000	400	1,50
	1488	1067	436	1,50
	878	1000	382	1,50
	1756	1067	473	1,57
	1244	1000	455	1,59
Promedios	1268	1011	427	1,54
<u>+ E.S.</u>	<u>+ 128</u>	<u>+ 21</u>	<u>+ 14</u>	<u>+ 0,019</u>

Tabla 7

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales CONTROL sacrificados por la TARDE.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
	<u>Corticosterona (μg/100 ml)</u>	<u>Corticosterona (μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico (μg/g)</u>	<u>Peso (mg/par)</u>
	33	39	5920	63
	35	37	4240	65
	28	53	4480	57
	30	46	4960	73
	33	63	4480	49
	35	53	5440	63
	27		5500	51
	25		5360	49
Promedios	30,7	48,5	5048	58,8
<u>+ E.S.</u>	<u>+ 1,34</u>	<u>+ 4,00</u>	<u>+ 212</u>	<u>+ 3,08</u>

Tabla 8

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales CONTROL sacrificados por la TARDE.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	652	943	421	1,53
	826	943	463	1,50
	978	1200	526	1,47
	913	1029	442	1,59
	913	1029	442	1,41
	783	1114	442	1,46
	1109	1200	484	1,40
		1257	418	1,39
Promedios	882	1089	455	1,47
\pm E.S.	\pm 55	\pm 43	\pm 13	\pm 0,024

Tabla 9

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales sometidos a INMOVILIZACION y sacrificados por la MAÑANA.

Plasma		Glándula		
Corticosterona ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)		Corticosterona ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Acido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Peso (mg/par)
72		62	2908	60
55		75	2545	46
55		75	2908	59
76		67	2617	50
52		75	2399	50
48		67	3199	48
48		75	2617	57
48		51		49
45		49		43
50		52		44
50		51		44
47		56		42
Promedios	53,8	62,9	2742	49,3
\pm E.S.	$\pm 3,51$	$\pm 3,09$	± 104	$\pm 1,81$

Tabla 10

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales sometidos a INMOVILIZACION y sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	955	1326	323	1,64
	885	1389	354	1,77
	955	1323	446	1,76
	1057	814	369	1,60
	870	956	369	1,64
	913	793	385	1,74
	957	936	369	1,61
	1043	936	385	1,72
	1022	956	385	1,72
	978	834	419	1,72
	870			
Promedios	948	1026	380	1,69
\pm E.S.	\pm 20	\pm 72	\pm 11	\pm 0,020

Tabla 11

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales sometidos a INMOVILIZACION y sacrificados por la TARDE.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
<u>Corticosterona</u> <u>(μg/100 ml)</u>		<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
57		79	3600	52
41		60	2320	33
42			2960	46
49		58	3040	38
42		61	2640	35
47		75	3200	40
38		53	3765	32
			2480	42
Promedios	45,1	64,3	3001	39,8
\pm E.S.	\pm 2,43	\pm 4,20	\pm 182	\pm 2,41

Tabla 12

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales sometidos a INMOVILIZACION y sacrificados por la TARDE.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	1043	914	329	1,60
	1304	1200	353	1,57
	1565	1257	365	1,57
	1761	1086	353	1,64
	1696	1314	412	1,53
	1826	1200	412	
	1891	1086	376	1,66
	1565			1,75
Promedios	1581	1151	371	1,62
\pm E.S.	\pm 101	\pm 51	\pm 12	\pm 0,028

Tabla 13

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sacrificados por la MAÑANA.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
	<u>Corticosterona (μg/100 ml)</u>	<u>Corticosterona (μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico (μg/g)</u>	<u>Peso (mg/par)</u>
	2	6	5422	48
	20	20	5600	68
	11	25	5067	45
	33	44	4978	56
	4	6	5511	48
	8	7	5689	52
	8	16	5778	47
	14	39	6222	53
Promedios	12,5	20,4	5533	52,1
\pm E.S.	\pm 3,55	\pm 5,24	\pm 140	\pm 2,60

Tabla 14

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	1098	933	400	1,47
	1098	933	436	1,62
	878	1000	382	1,53
	1829	1067	345	1,74
	1829	1067		1,80
	1244	867	436	1,64
	1976	867	436	1,45
	1244	1067	436	1,54
Promedios	1400	975	410	1,60
<u>±</u> E.S.	<u>±</u> 147	<u>±</u> 31	<u>±</u> 14	<u>±</u> 0,044

Tabla 15

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sacrificados por la TARDE.

	Plasma	Glándula		
	Corticosterona ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	Corticosterona ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Acido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Peso (mg/par)
	22	47	4960	77
	37	47	5600	71
	35	44	5280	57
	35	43	4480	66
	25	40	4640	56
	25	32	4800	69
	28	39	4720	65
	28		5360	66
Promedios	29,3	41,7	4980	65,8
\pm E.S.	$\pm 1,97$	$\pm 1,99$	± 139	$\pm 2,83$

Tabla 16

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sacrificados por la TARDE.

<u>Glándula</u>		<u>Cerebro</u>		
Catecolaminas ($\mu\text{g/g}$)		Dopamina (ng/g)	Noradrenalina (ng/g)	Peso (g)
	913	857	345	1,38
	652	1143	436	1,49
	848	1200	400	1,41
	652	1086	400	1,41
	848	1086	345	1,49
	652	1086	382	1,50
	739	776	362	1,48
		776	362	1,60
Promedios	758	1001	379	1,47
<u>+</u> E.S.	<u>+</u> 42	<u>+</u> 60	<u>+</u> 11	<u>+</u> 0,025

Tabla 17

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la MAÑANA.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
<u>Corticosterona</u>		<u>Corticosterona</u>	<u>Acido ascórbico</u>	<u>Peso</u>
<u>(μg/100 ml)</u>		<u>(μg/g)</u>	<u>(μg/g)</u>	<u>(mg/par)</u>
45		60	2399	55
48		62	2908	62
58		75	3126	50
62		67	2747	39
52		73	2472	49
76		75	3272	69
76		71	2036	51
65		57	3344	58
Promedios	60,3	67,5	2788	54,1
\pm E.S.	\pm 4,18	\pm 2,51	\pm 163	\pm 3,22

Tabla 18

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	936	840	383	1,45
	1248	960	435	1,65
	1186	900	383	1,50
	811	1020	383	1,60
	998	1200	452	1,61
	874	1020	331	1,63
	1123	1080	418	1,60
		840	348	1,50
Promedios	1025	983	392	1,57
<u>±</u> E.S.	<u>±</u> 62	<u>±</u> 44	<u>±</u> 15	<u>±</u> 0,025

Tabla 19

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la TARDE.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/100 ml)</u>	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
	46	51	2720	30
	46	65	3636	31
	49	55	2816	43
	58	57	3200	28
	61	69	3360	40
	45	49	2400	32
	49	46	3040	48
	41	40	2880	45
Promedios	49,4	54,0	3007	37,1
\pm E.S.	\pm 2,40	\pm 3,41	\pm 138	\pm 2,74

Tabla 20

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la TARDE.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	1500	840	317	1,64
	1187	780	345	1,64
	1750	720	372	1,60
	1312	930	386	1,60
	1437	840	359	1,51
	1062	870	345	1,73
	2062	960	372	1,53
	812	720	331	1,61
Promedios	1390	832	353	1,61
<u>+ E.S.</u>	<u>+ 139</u>	<u>+ 31</u>	<u>+ 8</u>	<u>+ 0,024</u>

Tabla 21

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la MAÑANA.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/100 ml)</u>	<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
	23	43	4160	44
	18	31	4736	39
	36	50	4608	42
	26	50	4608	48
	34	46	4608	47
	42	43	4608	43
	26	51	4480	36
			4608	43
Promedios	29,3	44,9	4552	42,7
\pm E.S.	\pm 3,15	\pm 2,63	\pm 61	\pm 1,39

Tabla 22

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	1286	927	430	1,58
	1500	900	385	1,73
	1214	982	489	1,46
	1428	982	415	1,61
	1357	927	415	1,65
	1571	845	385	1,47
	1928	791	355	1,64
	1571	900	385	1,68
Promedios	1482	907	407	1,60
<u>±</u> E.S.	<u>±</u> 78	<u>±</u> 23	<u>±</u> 14	<u>±</u> 0,034

Tabla 23

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la TARDE.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
<u>Corticosterona</u> <u>(μg/100 ml)</u>		<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
24		35	4286	38
24		31	3600	52
29		42	3463	46
28		51	3828	58
29		43	3143	53
31		40	2971	44
29		37	3486	51
		35	3257	48
Promedios	27,7	39,3	3504	48,8
\pm E.S.	\pm 1,02	\pm 2,20	\pm 147	\pm 2,17

Tabla 24

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la TARDE.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso</u> (g)
	1067	750	369	1,74
	933	850	354	1,78
	1267	1000	477	1,59
	889	1000	461	1,65
	1200	900	415	1,67
	822	1025	400	1,60
	1067	1050	385	1,53
	1400	925	415	1,62
Promedios	1081	938	410	1,65
\pm E.S.	\pm 70	\pm 36	\pm 15	\pm 0,029

Tabla 25

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la MAÑANA.

	Plasma	Glándula		
	Corticosterona ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Corticosterona ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Acido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Peso (mg/par)
	53	71	3712	49
	39	51	2752	41
	48	63	2688	38
	53	71	1984	43
	46	58	2624	37
	35	56	2816	42
	48	71	3136	38
	48	53	3008	38
Promedios	46,3	61,8	2840	40,8
\pm E.S.	$\pm 2,24$	$\pm 2,98$	± 174	$\pm 1,40$

Tabla 26

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	1545	914	368	1,63
	1364	971	336	1,63
	1364	857	304	1,63
	1273	1057	352	1,51
	1545	857	304	1,63
	1273	914	336	1,63
	1273	1114	400	1,51
	1454			
Promedios	1386	955	343	1,59
<u>±</u> E.S.	<u>±</u> 41	<u>±</u> 37	<u>±</u> 13	<u>±</u> 0,022

Tabla 27

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la TARDE.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
<u>Corticosterona</u> <u>(μg/100 ml)</u>		<u>Corticosterona</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
41		58	2240	38
50		47	2160	47
45		42	2320	46
34		35	1888	42
40		40	2144	40
41		37	1712	38
50		53	2032	32
		58	2800	48
Promedios	43,0	46,3	2162	41,4
\pm E.S.	\pm 2,18	\pm 3,25	\pm 114	\pm 1,94

Tabla 28

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la TARDE.

	Glándula	Cerebro		
	Catecolaminas (μ g/g)	Dopamina (ng/g)	Noradrenalina (ng/g)	Peso (g)
	553	667	307	1,50
	974	711	373	1,60
	842	844	293	1,60
	500	711	327	1,70
	1026	933	320	1,62
	921	978	333	1,50
	1053	1115	347	1,53
	895		320	1,53
Promedios	845	857	328	1,57
\pm E.S.	\pm 74	\pm 67	\pm 9	\pm 0,024

Tabla 29

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la MAÑANA.

Plasma		Glándula		
	Corticosterona ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Corticosterona ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Acido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Peso (mg/par)
	10	22	4952	66
	18	26	5224	45
	12	28	4800	42
	22	32	5181	57
	12	23	4724	50
	14	22	5029	53
	19	28	5029	49
	17	24	4571	56
Promedios	15,5	25,6	4939	52,3
\pm E.S.	$\pm 1,46$	$\pm 1,25$	± 80	$\pm 2,79$

Tabla 30

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	794	912	385	1,86
	1558	936	385	1,63
	1500	1104	415	1,60
	1206	1104	462	1,73
	1447	1252	460	1,62
	1395	1252	420	1,68
	1500	1096	460	1,62
	1395	1252	480	1,63
Promedios	1349	1114	433	1,67
\pm E.S.	\pm 88	\pm 48	\pm 13	\pm 0,031

Tabla 31

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la TARDE.

<u>Plasma</u>		<u>Glándula</u>		
<u>Corticosterona</u> <u>(µg/100 ml)</u>		<u>Corticosterona</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Acido ascórbico</u> <u>(µg/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(mg/par)</u>
17		27	5249	42
14		34	5105	61
15		37	5790	64
22		39	5486	71
21		29	5486	66
16		27	4952	42
16		29	5105	63
16		38	5181	48
16		42	5943	41
17		34	5333	54
18		32	5181	49
17		29	5181	50
16		37	5333	54
17		37	4952	57
		37	4571	73
		42	4876	44
Promedios	17,0	34,4	5233	54,9
± E.S.	± 0,57	± 1,26	± 85	± 2,62

Tabla 32

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sacrificados por la TARDE.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> <u>(μg/g)</u>	<u>Dopamina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Noradrenalina</u> <u>(ng/g)</u>	<u>Peso</u> <u>(g)</u>
	805	860	338	1,69
	1127	1220	482	1,65
	1127	1100	482	1,65
	1255	940	462	1,64
	1320	940	462	1,64
	1255	1020	503	1,70
	1513	940	441	1,56
	869	1100	441	1,65
	1033	1223	540	1,70
	767	1177	440	1,80
	1400	1269	560	1,72
	900	1269	500	1,72
	656	1315	540	1,72
	1833	1408	520	1,82
	1500	1362	520	1,62
	1433	1269	460	1,65
Promedios	1175	1151	481	1,68
\pm E.S.	\pm 81	\pm 42	\pm 13	\pm 0,016

Tabla 33

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la MAÑANA.

Plasma		Glándula		
	Corticosterona ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Corticosterona ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Acido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Peso (mg/par)
	75	69	2743	66
	81	77	2971	45
	81	80	3352	42
	63	69	3048	57
	70	81	3352	50
	58	66	2667	53
	36	45	2590	49
	54	44	2743	56
Promedios	64,8	66,4	2933	52,2
\pm E.S.	\pm 5,43	\pm 5,15	\pm 106	\pm 2,67

Tabla 34

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina en cerebro y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la MAÑANA.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> ($\mu\text{g/g}$)	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso</u> (g)
	1029	984	338	1,86
	1088	1008	369	1,63
	853	1056	354	1,60
	971	1320	338	1,73
	868	1096	340	1,62
	1079	1148	420	1,68
	1237	1356	440	1,62
	1132	1200	340	1,63
Promedios	1032	1146	367	1,67
+ E.S.	+ 46	+ 49	+ 14	+ 0,031

Tabla 35

Niveles de corticosterona en plasma, corticosterona y ácido ascórbico en glándula adrenal y peso de las glándulas adrenales de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la TARDE.

	Plasma		Glándula	
	Corticosterona ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Corticosterona ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Acido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Peso (mg/par)
	50	63	4000	43
	43	56	3200	44
	63	50	2779	35
	56	50	2442	45
	67	56	2863	43
	52	58	2779	43
	65	60	3116	38
	71	53	3116	40
	59		2779	47
	66		2947	61
Promedios	59,2	55,8	3002	43,9
\pm E.S.	\pm 2,80	\pm 1,63	\pm 131	\pm 2,19

Tabla 36

Niveles de catecolaminas en glándula adrenal, dopamina y noradrenalina y peso del cerebro de animales tratados durante ocho días con FENOBARBITAL más DIFENILHIDANTOINA y sometidos a INMOVILIZACION, sacrificados por la TARDE.

	<u>Glándula</u>	<u>Cerebro</u>		
	<u>Catecolaminas</u> (μ g/g)	<u>Dopamina</u> (ng/g)	<u>Noradrenalina</u> (ng/g)	<u>Peso</u> (g)
	1219	910	348	1,49
	1250	1065	383	1,52
	1625	948	330	1,55
	1375	1026	400	1,72
	1687	1181	383	1,45
	937	1065	366	1,53
	1625	1103	383	1,49
	1437	1065	400	1,55
	1375	1181	366	1,50
	1187	1026	348	1,55
Promedios	1372	1057	371	1,54
\pm E.S.	\pm 74	\pm 28	\pm 7	\pm 0,023

D I S C U S S I O N

Se han identificado gran número de ritmos biológicos con distintas periodicidades; Pincus (1947) fué el primero en sugerir la posibilidad de la existencia de variaciones diurnas en la función adrenocortical, confirmando esta hipótesis con los resultados de estudios preliminares acerca de las variaciones observadas en la excreción de 17-cetosteroides en la orina de personas sanas adultas. Se utiliza el término circadiano para designar o describir determinadas fluctuaciones que presentan algunos parámetros hormonales con un máximo y un mínimo de actividad en un período de 24 horas.

Posteriormente han ido apareciendo diversos estudios llevados a cabo en el hombre y en animales de experimentación acerca de las variaciones de tipo circadiano que presenta el eje hipófisis-adrenal, particularmente en lo concerniente a las fluctuaciones observadas en la síntesis y liberación de las hormonas adrenocorticales (Halberg y col., 1959; Critchlow y col., 1963; Krieger y Krieger, 1966).

Sin embargo en la actualidad se conoce poco acerca

de la naturaleza y sobre todo del control de las variaciones de tipo circadiano que exhibe la función adrenocortical en los mamíferos; diversos investigadores (Krieger, 1974) vienen postulando la existencia en estos organismos de algún tipo de sincronizador de este ritmo y que el desencadenante de dichos cambios, pudiera ser la alternancia luz-oscuridad, la transición actividad-sueño u otros factores de naturaleza aún desconocida.

Varios estudios (Oppenheimer y col., 1961; Krieger y Krieger, 1966) evidencian las fluctuaciones que presentan los niveles de cortisol, principal hormona adrenocortical que se sintetiza y libera a la circulación sanguínea en la especie humana, indicando unos valores altos en las primeras horas de la mañana, entre las 6 y las 8 horas, descendiendo posteriormente hasta observar un mínimo de actividad al llegar la medianoche.

Sin embargo en la rata, dada su característica de animal nocturno, realizando las determinaciones en condiciones basales fisiológicas y con una alternancia de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, distintos autores han descrito niveles bajos por la mañana en la concentración de corticosterona en plasma aumentando después hasta alcanzar el máximo

de actividad aproximadamente una hora antes de que comience el periodo de oscuridad (Critchlow y col., 1963; Simon y George, 1975).

Es muy necesario en este tipo de estudios, especificar las condiciones experimentales en que se realiza la investigación teniendo en cuenta el sexo y cepa del animal utilizado, metodología empleada en las distintas determinaciones, esquema de horas luz-oscuridad, frecuencia en la toma de muestras, horas de ingestión de comida y/o bebida, pues se ha descrito que cualquier modificación introducida en las condiciones establecidas en cada estabulario puede ir acompañada de variaciones en la expresión de los máximos y mínimos de actividad en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal (Johnson y Levine, 1973; Morimoto y col., 1975).

En nuestro estudio, observamos que la concentración de corticosterona en plasma por la tarde es casi cuatro veces superior al valor promedio que obtenemos en las ratas bajo las mismas condiciones y sacrificadas por la mañana y que los niveles de corticosterona en glándula adrenal por la tarde son el doble del promedio obtenido por la mañana.

Las diferencias obtenidas en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal en los animales no tratados y en los controles, a las dos horas elegidas para el sacrificio dentro del período de 24 horas, son consecuencia de la característica variación de tipo circadiano que presentan los niveles de esta hormona en la rata; nuestros valores están de acuerdo con los modelos establecidos en otros laboratorios para ratas macho (Retiene, 1970; Simon y George, 1975).

Por otro lado, aún cuando diferentes tanto desde un punto de vista embriológico como por los distintos compuestos que sintetizan y liberan, la estrecha relación anatómica existente entre la corteza y la médula de la glándula adrenal en los mamíferos, unido a la relación fisiológica observada entre las hormonas de ambos órganos en la respuesta a situaciones de "stress", ha conducido a diversos investigadores a postular distintas hipótesis; una de ellas sostenida por Wurtman y Axelrod (1965) indica que las altas concentraciones de hormonas adrenocorticales que procedentes de la corteza perfunden la médula adrenal, podrían controlar la actividad de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa que cataliza la conversión de noradrenalina en adre-

nalina, modulando de este modo la síntesis de catecolaminas en la médula adrenal.

Scheving y col. (1968b) realizaron determinaciones del contenido de adrenalina en glándula adrenal en ratas macho cada 2 horas por espacio de 24 horas, con una iluminación de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, obteniendo los niveles más altos entre las 9 y 13 horas y los menores entre las 20 y 24 horas; estos autores sugirieron que pudiera existir alguna relación entre las conocidas variaciones que presentan los niveles de hormonas adrenocorticales y las fluctuaciones observadas por ellos acerca del contenido de adrenalina en la glándula adrenal de la rata.

En nuestro estudio también hemos observado respecto a la concentración de catecolaminas totales en glándula adrenal, unos valores inferiores en los animales intactos o en los control sacrificados por la tarde que en los respectivos grupos sacrificados por la mañana. Nuestros resultados y los obtenidos por Scheving y col. (1968b) pudieran ser explicados en base a diferencias en la actividad simpática basal a lo largo de las 24 horas del día, si bien no pueden ser descartadas otras posibilidades.

Sin embargo, estos resultados acerca de las variaciones que a diferentes horas del día se producen en los niveles basales de corticosterona en plasma y catecolaminas en glándula adrenal, coincide con los argumentos apuntados por otros autores (Kitabchi y col., 1968; Rivas y Borrell, 1971; Borrell y Borrell, 1974), en contra de la hipótesis de que los glucocorticoides participen de una forma especialmente activa en el proceso de formación de la adrenalina. En efecto, en nuestros resultados observamos que existe una relación inversa entre los niveles de corticosterona tanto en glándula adrenal como en plasma y la concentración de catecolaminas en glándula adrenal en los animales sacrificados por la mañana y por la tarde.

Las pruebas aportadas por numerosos estudios anatómicos y farmacológicos entre otros (Carlsson y col., 1962; Andén y col., 1964; Fuxe y Hökfelt, 1969), acerca de la presencia de una extensa red de neuronas catecolaminérgicas, principalmente en la eminencia media del hipotálamo, en conexión con el plexo capilar primario del sistema porta-hipotálamo-hipofisario, unido al hecho de que parece ser precisamente en este área donde son secretados por células especializadas los diferentes factores de liberación de las hormonas

hipofisarias, ha hecho sugerir a distintos investigadores (Battacharya y Marks, 1969a; Ganong, 1970; Scapagnini y col., 1970; Van Loon y col., 1971a,b), una posible implicación de los diversos neurotransmisores en el control de la secreción de las hormonas de la hipófisis anterior. Este hecho, no obstante no excluye la posibilidad de que otras áreas extrahipotalámicas como el sistema límbico participen, mediante una acción estimulante o inhibidora sobre el hipotálamo, en la modulación de la secreción de distintas hormonas hipofisarias (Borrell y col., 1976, 1977) y en particular de la hormona adrenocorticotropa (Zolovick, 1972).

Al igual a como ya hemos expuesto para la función del eje hipófisis-adrenal, algunos estudios indican variaciones a lo largo de un periodo de 24 horas, en los niveles de dopamina y noradrenalina en el cerebro de la rata o en regiones específicas del mismo, aunque existen en la literatura discrepancias respecto a las horas del día en que se producen los valores máximos y los mínimos. Scheving y col. (1968a) llevaron a cabo experimentos en épocas cronológicamente diferentes con el fin de observar, manteniendo a los animales bajo condiciones estandarizadas y empleando idénticos procedimientos experimentales, la reproducibilidad

en el modelo de las fluctuaciones para cada bioamina. Estos autores indican, que la concentración de dopamina y noradrenalina en el cerebro de ratas macho sometidas a iluminación desde las 6 hasta las 18 horas, seguido de 12 horas de oscuridad y sacrificando los animales cada hora por espacio de 24 horas, no siguen el modelo de variación circadiana observada para otros parámetros biológicos sino que presentan más de un ciclo durante las 24 horas, es decir, se observa un máximo y un mínimo de actividad en un intervalo aproximado de 5 a 8 horas.

Otros autores (Simon y George, 1975) estudiando cada cuatro horas durante 24 horas, la concentración de dopamina y noradrenalina en distintas áreas del cerebro de la rata, con un esquema de luz desde las 7 hasta las 19 horas y 12 de oscuridad, han encontrado fluctuaciones en los niveles de estas bioaminas en todas las regiones estudiadas, presentando la dopamina en algunas de estas zonas varios máximos a lo largo de las 24 horas del día.

No obstante, en este tipo de estudios es necesario tomar con precaución los resultados, ya que en general las variaciones en los niveles de las bioaminas son reflejo de los procesos de síntesis, almacenamiento, liberación y cata-

bolismo de estos compuestos. Así mismo, las condiciones experimentales en que se realizan los experimentos son de gran importancia y por ejemplo, en los estudios anteriormente comentados de Scheving y col. (1968a), las variaciones que observan en los niveles de noradrenalina y dopamina en cerebro pudieran ser, al menos en parte, consecuencia del hecho de que en este trabajo, a la hora de sacrificar los animales, los toman del estabulario y los transportan a una habitación cercana, hecho que se sabe modifica la secreción basal de corticosterona en la rata (Barrett y Stockham, 1963) y que no puede descartarse que pueda influenciar el metabolismo de catecolaminas en cerebro.

En nuestro trabajo, aún cuando no se puede excluir que existan fluctuaciones a lo largo de un periodo de 24 horas, no encontramos diferencias significativas en los niveles de dopamina y noradrenalina a las dos horas del día en que se lleva a cabo el sacrificio de los animales control.

Numerosos experimentos se han llevado a cabo con el fin de esclarecer también la posible participación de los neurotransmisores en las variaciones de tipo circadiano que presentan los niveles de hormonas adrenocorticales en la

rata; la mayoría de ellos se han realizado utilizando fármacos que modifican la síntesis, liberación o catabolismo de las bioaminas o que alteran la actividad de los neurotransmisores.

Algunos autores (Scapagnini y col., 1970) indican que las variaciones circadianas observadas en los niveles de corticosterona en plasma de ratas control, bajo unas condiciones de 14 horas de luz y 10 de oscuridad y tomando las muestras cada cuatro horas durante las 24 horas del día, no son patentes en animales que han sido tratados previamente con el fármaco α -metil-p-tirosina, inhibidor de la biosíntesis de catecolaminas a nivel de la enzima tirosina-hidroxilasa que cataliza el paso de L-tirosina a L-DOPA, habiendo postulado que posiblemente estos neurotransmisores ejercerían una influencia de naturaleza inhibidora en el control de la secreción de ACTH en la rata.

Sin embargo, trabajos de otros autores (Ulrich y Yuwiler, 1973) indican que a pesar de los descensos obtenidos en los niveles de dopamina y noradrenalina inducidos por la administración de 6-hidroxidopamina en el cerebro de ratas macho, los niveles de corticosterona en plasma y/o en glándula adrenal mantienen las características variacio-

nes circadianas con valores bajos por la mañana y altos por la tarde; estos autores, también observan que la concentración de dopamina en cerebro es significativamente inferior en los animales sacrificados a las 21 horas respecto de los sacrificados a las 9 de la mañana, mientras que los niveles de noradrenalina a las dos horas del día no presentan variaciones significativas.

Estudios de Asano y Moroji (1974) indican que las fluctuaciones observadas en ratas macho control en la concentración de noradrenalina en el hipotálamo con un valor máximo a las 22 horas y un mínimo a las 7 de la mañana, están abolidas en los animales tratados con metanfetamina, fármaco que induce descensos en los niveles de noradrenalina en el hipotálamo, mientras que las variaciones en los niveles de 11-hidroxycorticosteroides, caracterizadas por una elevación a las 6 de la tarde y un valor mínimo a las 2 de la mañana observadas en los animales control, persisten en las ratas tratadas con el fármaco y sacrificadas a intervalos de cuatro horas durante 24 horas.

En esta misma línea, Abe e Hiroshige (1974) utilizando ratas macho adultas con un modelo de 12 horas de luz

y 12 de oscuridad y sacrificio de los animales a las 8 horas de la mañana y a las 4 de la tarde, indican que a pesar de los descensos y/o aumentos en la concentración de noradrenalina en el hipotálamo inducidos por la administración de compuestos que alteran la síntesis o el catabolismo de las catecolaminas, los animales tratados presentan al igual que los correspondientes controles, valores de corticosterona en plasma bajos por la mañana y altos por la tarde, característicos de las variaciones circadianas de esta hormona.

Como se deduce de los trabajos, algunos de los cuales hemos tratado de exponer someramente, acerca de la posible participación de las catecolaminas en la regulación de la secreción basal de ACTH, parece por un lado existir evidencias acerca de una posible implicación de la noradrenalina como inhibidor de la secreción de ACTH, mientras que resultados de otros investigadores, no están de acuerdo en atribuir una importancia fundamental a la dopamina y noradrenalina en la modulación de las funciones neuroendocrinas del hipotálamo.

La confusión y discrepancias existentes acerca de la hipótesis de que los neurotransmisores sean mediadores

en el control de la secreción de ACTH, pueden ser debidas en parte al empleo de diferentes modelos experimentales, ya que se sabe que modificaciones en el estado endocrino de un animal pueden ir acompañadas de variaciones en los niveles de catecolaminas en el hipotálamo (Fuxe y col., 1973).

Por nuestros resultados, aún cuando no puede excluirse que las catecolaminas del cerebro puedan participar en la modulación de la secreción basal de ACTH y por tanto de corticosteroides, se podría apuntar más bien a la línea de la hipótesis de otros autores anteriormente comentados de que cambios en los niveles de estas bioaminas parecen no ser determinantes en la modulación del ritmo circadiano que presentan las hormonas adrenocorticales.

Se sabe, que en general cualquier tipo de "stress" tiende a producir una serie de respuestas biológicas que se traduce, entre otras, en hipertrofia de las glándulas adrenales, aumento de la secreción de corticosteroides, de catecolaminas y otras hormonas, existiendo en algunos casos una secreción diferencial de estas hormonas en función de la naturaleza del estímulo.

El tipo de "stress" elegido en nuestro estudio

- inmovilización durante dos horas - vemos que es efectivo en activar el eje hipófisis-adrenal, puesto que induce aumentos significativos en la concentración de corticosterona en plasma y en glándula adrenal, tanto por la mañana como por la tarde, respecto a los correspondientes valores basales; esta esperada activación es consistente con trabajos anteriores de otros laboratorios realizados con éste u otros tipos de estímulos (Abe e Hiroshige, 1974; Yasuda y col., 1976).

Los valores promedio basales encontrados en la concentración plasmática y adrenal de corticosterona en los animales sacrificados a las dos horas del día elegidas dentro del periodo de 24 horas, ya vimos que son reflejo de la variación circadiana que presenta este parámetro en la rata bajo condiciones fisiológicas. Si tomamos estos valores como basales y consideramos como valores de "stress" los obtenidos en los animales sometidos a las mismas condiciones pero que dos horas antes del sacrificio son inmovilizados, sacrificándolos a las 10 de la mañana o a las 5 de la tarde, entonces la diferencia entre los niveles basales y los obtenidos después de la estimulación nos podría proporcionar una medida de la respuesta del eje hipófisis-adrenal a este

tipo de "stress".

El incremento en los niveles de corticosterona en plasma por la mañana es de 45 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, el cual es sensiblemente diferente del obtenido cuando se sacrifican los animales por la tarde, donde observamos un aumento de 14 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$; las diferencias obtenidas en la concentración de corticosterona en la glándula adrenal son del mismo rango a las presentadas para el plasma, siendo de 42 $\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido adrenal en los animales sacrificados por la mañana y de 16 $\mu\text{g}/\text{g}$ en los de la tarde.

Por consiguiente, en nuestro trabajo encontramos una respuesta cuantitativamente diferente del eje hipófisis-adrenal a la inmovilización dependiendo de la hora del día - mañana o tarde - en que aplicamos el estímulo, siendo ésta mayor por la mañana, cuando los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal son bajos, y menor por la tarde, a una hora del día en que los niveles de corticosterona son significativamente superiores a los observados por la mañana en los animales bajo las mismas condiciones.

Es de destacar no obstante, que aún cuando los niveles basales de corticosterona plasmática y adrenal a los

dos tiempos elegidos dentro del ciclo adrenocortical de 24 horas son significativamente diferentes, así como los incrementos observados a las dos horas del día como consecuencia de la aplicación del estímulo, los valores finales obtenidos al sacrificar los animales después de la aplicación del "stress" no difieren entre sí significativamente a las dos horas en que se evalúa la función adrenocortical.

Han sido varios los trabajos que se han realizado con el fin de estudiar si la respuesta a una situación de "stress" aplicada a distintas horas dentro de las 24 horas del día evaluada en términos de secreción de ACTH y/o corticosteroides, está en relación con las variaciones de tipo circadiano que presenta la función del eje hipófisis-adrenal, o por el contrario son independientes de la hora del día en que se estimulan los animales.

Zimmermann y Critchlow (1967) llevaron a cabo un estudio en ratas hembra sometidas a dos tipos de estimulación, por éter y por inmovilización durante 3 minutos y sacrificando los animales a los 15 minutos del inicio del estímulo, a las 8,30 ó a las 16,30 horas e indicaron que las variaciones fisiológicas en los niveles basales en la

concentración de corticosterona en plasma no parecen influir en la respuesta adrenocortical a estos estímulos, ya que encuentran incrementos similares tanto si el "stress" se aplica por la mañana como por la tarde.

Dunn y col. en 1972 realizaron un trabajo con un modelo experimental similar al anteriormente descrito por Zimmermann y Critchlow (1967) pero en el cual toman muestras de sangre cada tres horas durante el periodo de 24 horas; realizan el trabajo en ratas machos y hembras determinando niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal en condiciones basales y después de la aplicación del estímulo. Indican estos autores que aún cuando a todas las horas en que se aplica el estímulo, tanto en las ratas machos como en las hembras, se produce un aumento en la secreción de corticosterona, este incremento es inferior cuando los niveles basales son altos que cuando dichos niveles son bajos. En nuestros resultados observamos un hecho semejante al indicado por Dunn y col. (1972) aún cuando existen diferencias en el modelo experimental seguido; es decir, animales estimulados por la mañana presentan un incremento en la secreción de corticosterona en plasma y en glándula adrenal superior al obtenido en los animales sacrificados por

la tarde y sometidos al mismo estímulo.

En este tipo de estudios hay que tener muy en cuenta que las variaciones en los resultados pueden ser debidas además de a la frecuencia en la toma de muestras de sangre durante las 24 horas del ciclo adrenocortical, a que la respuesta a un determinado estímulo está en función de diversas variables entre las que no se debe olvidar la intensidad y duración del mismo, así como al intervalo de tiempo que transcurre entre la terminación de la estimulación y el sacrificio de los animales o también al procedimiento de la toma de muestras, puesto que en la mayoría de los trabajos se realiza tomando la sangre directamente de la vena yugular, para lo cual es necesario anestesiarse al animal y pensamos que estos valores a veces no se pueden tomar como basales desde un punto de vista estricto ya que el animal puede encontrarse bajo los efectos de un "stress" adicional.

No está todavía aclarado, si existe una interacción entre los mecanismos encargados del control de la respuesta del eje hipófisis-adrenal al "stress" y aquellos responsables de las variaciones circadianas de este eje (Redgate, 1976).

En este contexto, también Zimmermann y Critchlow (1967) en base a los resultados obtenidos en sus experimentos, apuntan una posible disociación funcional entre los mecanismos neurales responsables de la modulación de la secreción de ACTH en condiciones basales y en respuesta al "stress"; sin embargo, Gibbs (1970) aún cuando con un modelo experimental muy diferente, ya que además de otros factores introduce la administración de dexametasona con el fin de inhibir la variación en los niveles basales de corticosterona entre la mañana y la tarde, encuentra bajo esas condiciones una respuesta mayor al estímulo por éter aplicado por la tarde que por la mañana, postulando así una posible interconexión entre ambos mecanismos de control.

Nuestros resultados respecto a las diferencias en la actividad del eje hipófisis-adrenal que se produce en respuesta a la aplicación del "stress" de inmovilización a los dos tiempos estudiados, evaluada en términos de niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal, coinciden con los presentados por Yasuda y col. (1976) los cuales someten ratas macho a diferentes tipos de "stress" por la mañana y por la tarde. Estos autores indican que ya que la concentración de corticosterona en plasma es reflejo de

múltiples factores que incluyen entre otros la concentración de ACTH circulante, la sensibilidad de la glándula adrenal a esta hormona y la distribución periférica y/o metabolismo de la corticosterona y/o ACTH, conviene analizar estos factores individualmente. Sus resultados indican que la exposición al éter durante veinte minutos induce en los animales un mayor incremento en la secreción de ACTH en plasma por la mañana, cuando los niveles de corticosterona son bajos, que por la tarde, cuando dichos niveles son altos; estos investigadores postulan que en respuesta al "stress" se produce un mayor incremento en la secreción de ACTH y una mayor sensibilización de las glándulas adrenales a esta hormona por la mañana que por la tarde y que por tanto no es de extrañar el mayor incremento observado en los niveles de corticosterona inducido por el "stress" cuando es aplicado por la mañana a cuando lo es por la tarde.

Trabajos muy recientes (Engeland y col., 1977) realizados con el fin de aportar nuevos conocimientos al problema de la influencia o no de las variaciones de tipo circadiano en la respuesta a la secreción de ACTH por la aplicación de un "stress" indican, en base a los resultados

obtenidos en varios experimentos en los que utilizan ratas hembra intactas y adrenalectomizadas, que las variaciones en los niveles de corticosterona en plasma pueden influir directamente en la respuesta al "stress" de inyección intraperitoneal de solución salina.

Nuestros resultados, aún cuando obtenidos con un tipo de estimulación de los animales diferentes al seguido en otros trabajos, coinciden con la sugerencia aportada por otros autores (Yasuda y col., 1976) de que no se puede esperar que la aplicación de un "stress" proporcione un incremento en la secreción de corticosterona que se adicione al nivel basal ya existente del esteroide en el momento del día en que se aplica dicho estímulo, hecho que corrobora la hipótesis de Dallman y Yates (1969) en la que sugieren la no linealidad en la respuesta del eje hipófisis-adrenal a estímulos de mayor intensidad que los implicados en la secreción basal de ACTH.

En nuestro estudio observamos, paralelamente al incremento en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal que se produce en respuesta a la inmovilización, un descenso en la concentración de ácido ascórbico

en la glándula adrenal tanto en los animales sacrificados por la mañana como por la tarde, que representa respecto de los animales control un 52 y 58 por ciento respectivamente. El hecho de que la glándula adrenal de los mamíferos contenga cantidades relativamente altas de ácido ascórbico unido a la observación de que en la rata, bajo unas condiciones experimentales determinadas, la aplicación de un "stress" o la administración de ACTH esté asociada con un rápido descenso en la concentración de este ácido, ha hecho sugerir desde hace tiempo una posible implicación de este compuesto en el proceso de la estereidogénesis adrenal; sin embargo, todavía se desconoce el exacto papel que juega el ácido ascórbico en la fisiología de la glándula adrenal.

Desde hace tiempo se ha venido utilizando el descenso en la concentración de ácido ascórbico en la glándula adrenal como medida indirecta de la secreción de hormona adrenocorticotropa (Sayers y Sayers, 1948; Vernikos-Danellis, 1965). Sin embargo, son varios los trabajos realizados en distintas especies animales en los que una hipersecreción de hormona adrenocorticotropa no va siempre acompañada de una disminución en los niveles de este ácido en la glándula adrenal; entre otros, estudios llevados a

cabo utilizando el gato como animal de experimentación indican que el incremento en los niveles de corticosteroides inducidos por distintos tipos de tratamiento - morfina en dosis aguda, insulina, glucagón, entre otros - no modifica los niveles de ácido ascórbico en glándula adrenal (Lloréns y col., 1973; Borrell y col., 1974, 1975).

Pero en la respuesta del organismo a una situación de "stress", además de una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que se traduce en incrementos en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal, se produce también una estimulación del sistema nervioso simpático que puede conducir a descensos en la concentración de catecolaminas en la glándula adrenal (Vogt, 1954) así como, según algunos autores (Maynert y Levi, 1964; Moore y Lariviere, 1964), a descensos en el contenido de noradrenalina en cerebro, habiéndose postulado que el hipotálamo pudiera ser el centro encargado de coordinar e integrar la respuesta neuroendocrina de adaptación y defensa del organismo animal a la situación de "stress".

Hemos observado descensos en la concentración de adrenalina en glándula adrenal en los animales sacrificados

por la mañana después de ser sometidos a inmovilización, pudiendo ser este hecho un reflejo de la liberación de esta hormona a la circulación en respuesta a una estimulación simpática como ha sido sugerido por distintos autores (Maynert y Levi, 1964; Gordon y col., 1966).

Sin embargo, vemos una respuesta distinta de los animales sometidos a las mismas condiciones pero sacrificados por la tarde, donde es patente un aumento significativo en la concentración de adrenalina en la glándula adrenal respecto a sus controles; es de destacar que a esta hora del día, el promedio en la concentración de adrenalina en los animales no sometidos a inmovilización es significativamente inferior respecto al promedio obtenido en los animales sacrificados por la mañana.

Son varios los estudios en los que se describen descensos en la concentración de noradrenalina en cerebro inducidos por la aplicación de distintos tipos de "stress" en la rata; estimulación eléctrica en las extremidades (Maynert y Levi, 1964), natación prolongada (Moore y Lariviere, 1964), exposición a bajas temperaturas y ejercicio muscular intenso (Gordon y col., 1966), entre otros.

En nuestro estudio hemos observado que, en respuesta al "stress" de inmovilización, se producen descensos en la concentración de noradrenalina en el cerebro a los dos tiempos del día en que han sido sacrificados los animales (mañana o tarde). Este hecho parece ser bastante generalizado toda vez que son distintos los autores que bajo diferentes tipos de estimulación han obtenido una respuesta semejante (Maynert y Levi, 1964; Moore y Lariviere, 1964; Gordon y col., 1966).

La no modificación en los niveles de dopamina en cerebro obtenida en respuesta al "stress" en los animales sacrificados por la mañana o por la tarde, respecto a los valores observados en los animales no inmovilizados, coincide con los resultados obtenidos en otros laboratorios bajo condiciones experimentales diferentes a las nuestras (Gordon y col., 1966; Bliss y col., 1968; Thierry y col., 1968).

El hecho de si los neurotransmisores dopamina y noradrenalina, están implicados en el control de la secreción de ACTH en respuesta al "stress", está sujeto a controversia. Hemos expuesto anteriormente en esta discusión,

trabajos a favor y en contra de una posible participación de estas catecolaminas en la regulación de la secreción de ACTH en condiciones basales del organismo.

Ganong y Lorenzen (1967) han indicado que distintas situaciones de "stress" como estimulación eléctrica, hemorragia e hipoglucemia, que van asociadas con un incremento en la secreción de ACTH, inducen también descensos en el contenido de noradrenalina en cerebro. Así mismo, existen evidencias farmacológicas a favor de que la liberación de noradrenalina que se produce como consecuencia de la aplicación de un "stress" podría actuar inhibiendo la secreción de ACTH en la rata (Fuxe y col., 1970).

En esta línea, otros autores indican una posible correlación negativa entre la concentración de noradrenalina en el hipotálamo y los niveles de corticosterona en plasma, postulando la existencia de un sistema adrenérgico en el hipotálamo inhibidor de la secreción de ACTH (Van Loon y col., 1971b; Scapagnini y col., 1972; Eisenberg, 1975). Sin embargo, trabajos de otros autores son indicativos de que los descensos en la concentración de noradrenalina en cerebro o en el hipotálamo no son obstáculo para que los

animales respondan a una situación de "stress" con un incremento en la secreción de corticosteroides en plasma (Anichkov y Ryzhenkov, 1973; Abe e Hiroshige, 1974).

Se ha sugerido que diversos tipos de fármacos pudieran ejercer alguna influencia sobre el sistema endocrino a través de efectos en el sistema nervioso, aún cuando los mecanismos de acción de estos procesos distan mucho de estar aclarados. De un modo particular se ha supuesto que drogas con propiedades sedantes, al interferir con los mecanismos de síntesis y/o liberación de diversos neurotransmisores del cerebro, puedan alterar la secreción de ACTH.

Podemos observar en nuestro trabajo que la administración crónica durante ocho días de una dosis diaria subanestésica de fenobarbital, no modifica la actividad del eje hipófisis-adrenal en los animales sacrificados por la mañana o por la tarde, tanto si son o no sometidos a inmovilización.

En un estudio muy reciente, Lindell y col. (1977) han observado que la inyección aguda de 60 mg/kg de fenobarbital sódico, induce fluctuaciones en los niveles de corti-

costeroides en plasma a lo largo de las 24 horas del día, aún cuando el promedio obtenido en las ratas tratadas con el fármaco no difiere significativamente del observado en los animales control. Algunos autores han indicado que el pentobarbital y compuestos afines pueden producir una disminución en la función del eje hipófisis-adrenal en diferentes condiciones experimentales (Rerup y Hedner, 1962; Borrell y col., 1974). Debe considerarse no obstante, que las dosis utilizadas en estos trabajos son muy superiores a las empleadas por nosotros y por tanto de rango anestésico.

Sin embargo, en relación a los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro, obtenemos una respuesta diferente en función de la hora del día (mañana o tarde) en que son sacrificados los animales y del estado endocrino de los mismos (inmovilizados o no); observamos un descenso significativo en la concentración de noradrenalina en cerebro en los animales tratados crónicamente con el fármaco y sacrificados por la tarde y descensos significativos en los niveles de dopamina en cerebro en los animales sometidos a inmovilización previamente tratados durante ocho días consecutivos con fenobarbital y sacrificados por la tarde; es decir, el fármaco induce descensos en la concentración de

dopamina cuyos niveles no habían sido modificados por el "stress" de inmovilización.

Maynert y Levi (1964) han observado que el descenso en los niveles de noradrenalina en cerebro inducidos por la estimulación eléctrica en las ratas es inhibido en los animales anestesiados previamente con fenobarbital, postulando que quizás este fármaco actúe bloqueando algunas conexiones nerviosas del sistema adrenérgico central. Estos mismos autores indicaron que una dosis aguda sedante de fenobarbital sódico no modifica el nivel de noradrenalina en cerebro respecto de sus controles, mientras que una dosis anestésica del barbitúrico incrementa significativamente el nivel de esta bioamina en cerebro.

Posteriormente se ha descrito, en base a estudios bioquímicos e histoquímicos, que la anestesia con barbitúricos disminuye la velocidad de síntesis de la dopamina en el cerebro de la rata (Corrodi y col., 1966) indicando otros autores (Persson y Waldeck, 1971) un descenso en la velocidad de síntesis de la noradrenalina en el cerebro de ratones sometidos a anestesia con pentobarbital.

También se ha indicado que el incremento en la ve-

locidad de síntesis de la noradrenalina en distintas regiones del cerebro de la rata, inducido por 4 horas de inmovilización, es inhibido en los animales tratados previamente con una sola dosis aguda de 100 mg/kg de fenobarbital sódico (Lidbrink y col., 1972). En nuestro estudio, con diferencias en las condiciones experimentales a las utilizadas en otros trabajos, principalmente en cuanto a dosis se refiere, toda vez que utilizamos dosis sedantes y no hipnóticas, no observamos en ratas pretratadas con fenobarbital durante ocho días modificaciones en el descenso de los niveles de noradrenalina en cerebro que se producen por la inmovilización. Al igual que en nuestros resultados, Nagura (1972) ha observado que la inmovilización en ratas macho causa descensos en la concentración de noradrenalina en cerebro y que el pretratamiento, aún con 100 mg/kg de fenobarbital, no modifica este descenso, indicando estos autores que las discrepancias con los resultados de Maynert y Levi (1964) pudieran ser debidas en parte a la diferencia en la naturaleza y duración del "stress".

Es de destacar no obstante, que la mayoría de los trabajos llevados a cabo con objeto de estudiar el efecto de los barbitúricos sobre la función adrenocortical y sobre

las catecolaminas del cerebro, se realizan mediante el empleo de inhibidores de la síntesis o catabolismo de estas bioaminas y utilizando dosis anestésicas del compuesto. En nuestro trabajo consideramos más interesante estudiar el efecto sobre los parámetros de nuestro estudio de una dosis diaria subanestésica de fenobarbital durante 8 días, dada la frecuencia con que este fármaco se viene utilizando en clínica humana para contrarrestar un gran número de estados convulsivos.

Pensamos que las distintas respuestas de los animales a la administración prolongada del barbitúrico, en términos de concentraciones de dopamina y noradrenalina en cerebro, pudieran ser debidas a aspectos cronobiofarmacológicos; recientemente diversos investigadores han demostrado cómo la respuesta del organismo a distintos fármacos es diferente en función de la hora del día en que son administrados (Reinberg y Halberg, 1971; Haus y col., 1974).

Entre otros trabajos se ha descrito (Davis, 1962) en ratones sometidos a anestesia con pentobarbital sódico una duración mayor del efecto anestésico por la mañana (horas de luz) que por la noche (horas de oscuridad); de todos

modos estimamos que no existen en la literatura suficientes trabajos para poder esclarecer de un modo concluyente la eficacia farmacológica de los barbitúricos en el hombre y en los animales, pues además del ciclo normal luz-oscuridad, hay otros factores que no deben excluirse, los cuales pueden modificar la respuesta a un determinado tratamiento farmacológico.

En la bibliografía consultada no hemos encontrado uniformidad en los resultados de los distintos investigadores respecto al efecto que el tratamiento agudo o prolongado con difenilhidantoína, fármaco también ampliamente utilizado en el tratamiento de estados convulsivos, tiene sobre el eje hipófisis-adrenal, indicando algunos autores (Costa y col., 1955; Bray y col., 1960) una estimulación del mismo en respuesta al tratamiento agudo con la droga seguido de una acción depresora si la administración del fármaco se mantiene durante meses; otros investigadores (Gupta y col., 1974) han observado una disminución en la función del eje hipófisis-adrenal en respuesta al tratamiento crónico con difenilhidantoína, habiéndose indicado que este fármaco actuaría probablemente interfiriendo de algún modo con los mecanismos neurales que modulan la secreción

de ACTH (Krieger, 1962; Asfeldt y Buhl, 1969; Gharib y Munoz, 1974).

Dill (1966) observó que una sola dosis de difenilhidantoína inducía incrementos en los niveles de corticosterona en plasma en ratas sacrificadas hasta cuatro horas después de la inyección, mientras que transcurridas ocho horas los niveles no eran significativamente diferentes a los obtenidos en condiciones basales. Este mismo autor indicó que el tratamiento durante veintiocho días con el fármaco no causaba diferencias significativas en los niveles de corticosterona en plasma al comparar los valores con los obtenidos en los controles, aún cuando debe considerarse que los valores promedio basales de los animales control utilizados por este autor difieren entre sí para los diferentes experimentos.

Queremos indicar que en la mayor parte de los trabajos consultados se estudia el efecto del fármaco sobre la función del eje hipófisis-adrenal sólo bajo un tipo de situación endocrina de los animales, no como en la investigación llevada a cabo por nosotros que estudiamos el efecto de la droga bajo diferentes condiciones endocrinas, hecho

que consideramos nos permite evaluar de un modo más completo el efecto de los fármacos empleados.

Con base en nuestros resultados podría indicarse que la difenilhidantoína administrada crónicamente durante ocho días ejerce un efecto sobre la función adrenocortical que se traduce en aumentos significativos en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal en los animales sacrificados por la mañana, cuando los niveles basales de esta hormona son bajos, de tal modo que este fármaco parece ser capaz de abolir las variaciones de tipo circadiano que presentan los niveles de corticosteroides en los animales intactos y control.

El hecho de que bajo nuestras condiciones experimentales el tratamiento con difenilhidantoína no cause variaciones en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal, ni produzca modificaciones en el descenso en los niveles de ácido ascórbico que induce la aplicación de la inmovilización, parece ser indicativo de que este fármaco, aún cuando capaz de modificar los niveles basales de corticosterona en plasma como anteriormente ha sido comentado, no altera la respuesta al "stress" de inmo-

vilización. Estas aparentes diferencias en el efecto del mismo fármaco pudieran tener explicación: por un lado puede sugerirse que la acción de la difenilhidantoína sea distinta en función de la situación endocrina de los animales; por otro lado, nuestros resultados coinciden con la hipótesis sugerida por algunos autores y anteriormente comentada (Mangili y col., 1966) de que los mecanismos que controlan la secreción basal de ACTH pudieran ser distintos y por tanto ser afectados de un modo diferente a los mecanismos encargados de modular la secreción de ACTH en respuesta al "stress".

Recientemente Bogoch y Dreyfus (1975) han realizado una extensa recopilación de algunas enfermedades que padece el hombre para las cuales parece ser efectivo el tratamiento terapéutico con difenilhidantoína; sin embargo, a pesar de la gran aplicación clínica de este fármaco, se desconoce casi por completo el mecanismo por el cual esta droga ejerce su acción anticonvulsivante, si bien resultados recientes parecen ser indicativos de que las catecolaminas del cerebro pudieran estar implicadas en estos procesos. Estudios "in vitro" (Hadfield, 1972) indican una posible inhibición en el metabolismo de las catecolaminas del cere-

bro; Lew (1975) somete ratas a una inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de la sal sódica de difenilhidantoína sacrificándolas cuatro horas después de la inyección, bien en la última fase del periodo de luz o del periodo de oscuridad, indicando que el fármaco, en función de la hora del día en que se lleva a cabo el sacrificio, es capaz de inducir cambios en la concentración de noradrenalina en el hipotálamo, cerebelo y en la parte inferior del tronco cerebral.

Del mismo modo que vimos en los animales sometidos a la administración crónica con fenobarbital se produce, como consecuencia del tratamiento prolongado con difenilhidantoína, una respuesta distinta de las catecolaminas en cerebro, dependiendo de si los animales han sido sometidos o no a inmovilización y de la hora en que se realiza el sacrificio de los mismos. Un hecho semejante al comentado para la dopamina y noradrenalina del cerebro también es observado para las catecolaminas en la glándula adrenal, si bien nuestros resultados no coinciden con la hipótesis mantenida hace tiempo por algunos autores de que las catecolaminas del cerebro y de la médula adrenal parecen responder paralelamente frente a distintos estímulos como partes integrantes del eje simpático-adrenal (Vogt, 1954;

Maynert y Levi, 1964; Maynert, 1967). Si estos efectos de la droga sobre las catecolaminas del cerebro y/o glándula adrenal pueden estar o no relacionados con la acción anticonvulsivante de la misma, requiere posteriores investigaciones.

En clínica humana es muy frecuente en el tratamiento de la epilepsia el empleo de ambas drogas (fenobarbital y difenilhidantoína); esta asociación, según algunos autores de gran utilidad debido a una postulada acción sinérgica entre ambos fármacos (Leppik y Sherwin, 1977), induce aumentos en la actividad anticonvulsivante y por ello realizamos experiencias sometiendo a los animales a las mismas condiciones que en las anteriormente discutidas y a tratamiento prolongado con esta asociación farmacológica.

Hay que destacar que la administración conjunta de estas drogas, bajo nuestras condiciones, induce un aumento en los niveles de corticosterona en plasma en los animales sacrificados por la mañana; sin embargo se produce el efecto contrario, es decir, es patente un descenso significativo en los niveles de esta hormona en plasma y en glándula adrenal en los animales sacrificados por la tarde; debe destacarse no obstante, que al igual que ocurría con el solo

tratamiento con difenilhidantoína, aún cuando cuantitativamente inferior, los niveles de corticosterona en plasma obtenidos en los animales sacrificados por la mañana después de la administración continuada durante ocho días con ambos fármacos, son de un rango semejante a los observados en los animales sacrificados después del mismo tratamiento pero por la tarde. También hemos de indicar que a diferencia de lo que ocurre para los correspondientes animales control, son del mismo rango los incrementos que se producen en los niveles de corticosterona en plasma al comparar los resultados obtenidos en animales sometidos a inmovilización y sacrificados por la mañana o por la tarde con los correspondientes a los animales tratados con ambos fármacos no sometidos a inmovilización y sacrificados a las mismas horas del día; este efecto es semejante al observado en los animales tratados sólo con difenilhidantoína, pero no en aquellos sometidos a la administración diaria de fenobarbital o en los controles. Estos resultados, unidos a los observados en los animales tratados con los distintos fármacos y no sometidos a inmovilización, parecen ser indicativos de que en el caso del efecto de la asociación del fenobarbital con la difenilhidantoína sobre la función del eje hipófisis-

adrenal, parece prevalecer la acción ejercida por este segundo fármaco, si bien el fenobarbital pudiera ser capaz de aminorar dicho efecto cuando se administra conjuntamente con difenilhidantoína.

A diferencia de lo que ocurre en el tratamiento único con fenobarbital o con difenilhidantoína en que se observan descensos en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro en algunos de los grupos experimentales realizados, en los animales sometidos al tratamiento conjunto con los dos fármacos no observamos variaciones bajo ninguna de las situaciones a que son sometidos los animales al comparar los resultados con los de los correspondientes controles. Debe tenerse en cuenta que dada la pequeña dispersión de los valores individuales obtenidos para cada grupo en relación a los niveles tanto de noradrenalina como de dopamina en cerebro, pequeñas diferencias entre los promedios de cada grupo llegan a ser significativas. De los resultados obtenidos en los animales tratados bien con una sola de las drogas o con ambas, parece poder sugerirse que el fenobarbital cuando se administra conjuntamente con difenilhidantoína, es capaz de modificar algunos de los efectos que este último fármaco ejerce sobre la concentración

de catecolaminas en cerebro; hemos observado que el fenobarbital es capaz de inhibir los descensos en los niveles de noradrenalina en cerebro que induce el tratamiento durante ocho días con difenilhidantoína en animales sacrificados por la mañana o por la tarde sólo después de ser sometidos a inmovilización.

El efecto del fenobarbital sobre los niveles de dopamina en cerebro parece ser distinto al comentado para la noradrenalina, toda vez que es sólo en aquellos animales sacrificados por la mañana o por la tarde pero no sometidos a inmovilización en los que este fármaco es capaz de inhibir el descenso en los niveles de dopamina en cerebro inducidos por la administración de difenilhidantoína. Si los efectos sobre las catecolaminas en cerebro que ambos fármacos producen por sí solos o conjuntamente son la causa de las modificaciones observadas en la función del eje hipófisis-adrenal o de la acción farmacológica de ambas drogas requiere posteriores investigaciones.

C O N C L U S I O N E S

Hemos estudiado el efecto que el tratamiento prolongado con fenobarbital y/o difenilhidantoína tiene sobre la concentración de corticosterona en plasma, corticosterona, ácido ascórbico y catecolaminas en la glándula adrenal y sobre los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro de animales sometidos o no a inmovilización durante dos horas, y sacrificados por la mañana o por la tarde.

Por los resultados obtenidos en este estudio puede concluirse:

- 1.- Obtenemos a las dos horas del día en que realizamos el sacrificio de los animales en condiciones basales, niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal indicativos de la existencia de las variaciones cíclicas que presenta este parámetro y que constituye el ritmo circadiano del mismo.
- 2.- La inmovilización, induce incrementos en los niveles de corticosterona en plasma y en glándula adrenal en animales sacrificados por la mañana, cuantitativamente superiores a

los obtenidos al sacrificar los animales por la tarde. Estas diferencias en los incrementos pensamos puedan ser consecuencia de las fluctuaciones de tipo circadiano en la secreción basal de ACTH y/o corticosterona. Estos resultados también nos hacen postular que los probables mecanismos de control para la secreción basal de ACTH pueden ser diferentes de aquellos encargados de modular la liberación de esta hormona en situaciones de "stress".

3.- El hecho de que descensos en la concentración de norepinephrina en cerebro vayan asociados con incrementos en los niveles de corticosterona en ratas sometidas a inmovilización, podría estar relacionado con un posible papel mediador de esta bioamina en el control de la secreción de ACTH.

4.- Obtenemos una respuesta distinta en función de la hora del día en que son sacrificados los animales respecto a la concentración de adrenalina en glándula adrenal en ratas inmovilizadas, hecho que podría estar relacionado con los diferentes valores basales que presenta esta hormona a los tiempos del día estudiados.

5.- La administración crónica de fenobarbital no modifica la actividad basal del eje hipófisis-adrenal, ni altera la

respuesta a la inmovilización.

6.- El tratamiento prolongado con difenilhidantoína, a diferencia del fenobarbital, modifica en condiciones basales la actividad del eje hipófisis-adrenal, aboliendo las variaciones circadianas obtenidas en los animales control; sin embargo, no modifica el efecto que la inmovilización tiene sobre dicho eje. Estos resultados también son coincidentes con el punto de vista de que los probables mecanismos de control para la secreción basal de ACTH pueden ser diferentes de aquellos encargados de modular la liberación de esta hormona en situaciones de "stress".

7.- En la administración conjunta de fenobarbital y difenilhidantoína parece prevalecer el efecto de este segundo fármaco sobre la actividad del eje hipófisis-adrenal.

8.- Nuestros resultados acerca de las variaciones obtenidas en los niveles de dopamina y noradrenalina en cerebro como consecuencia de los distintos tratamientos farmacológicos, no son concluyentes acerca del papel mediador que estas catecolaminas pueden tener en los efectos que las drogas utilizadas ejercen sobre la actividad del eje hipófisis-adrenal en las diferentes situaciones endocrinas estudiadas.

B I B L I O G R A F I A

Abe, K. e Hiroshige, T.; *Neuroendocrinology*, 14, 195, 1974.

Allen, J.P., Allen, C.F., Greer, M.A. y Jacobs, J.J.; en *Brain-Pituitary-Adrenal Interrelationships*, Eds. Brodish, A. y Redgate, E.S., S.Karger, Basel, p.99, 1973.

Andén, N.E., Carlsson, A., Dahlström, A., Fuxe, K., Hillarp, N.Å. y Larsson, K.; *Life Sci.*, 3, 523, 1964.

Anichkov, S.V. y Ryzhenkov, V.E.; en *Hormones and Brain Function* Ed. Lissák, K., Plenum Press, N.Y., p.243, 1973.

Asano, Y. y Moroji, T.; *Life Sci.*, 14, 1463, 1974.

Asfeldt, V.H. y Buhl, J.; *Acta Endocr.*, 61, 551, 1969.

Barrett, A.M. y Stockam, M.A.; *J.Endocr.*, 26, 97, 1963.

Battacharya, A.N. y Marks, B.H.; *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 165, 108, 1969.

Bliss, E.L., Ailion, J. y Zwanziger, J.; *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 164, 122, 1968.

- Bogoch, S. y Dreyfus, J.; A supplement to the Broad Range of Use of Diphenylhydantoin, (Breyfus Medical Foundation, N.Y.) vol II, 1975.
- Bonnycastle, D.D. y Bradley, A.J.; Endocrinology, 66, 355, 1960.
- Borrell, J. y Borrell, S.; Horm. Metab. Res., 6, 414, 1974.
- Borrell, J. y Borrell, S.; Neuroscience Letters, 4, 191, 1977.
- Borrell, S. y Estévez, C.; Zschr. Versuchstierk, 9, 124, 1967.
- Borrell, J., Lloréns, I y Borrell, S.; Hormone Res., 5, 351, 1974.
- Borrell, J., Lloréns, J. y Borrell, S.; Eur. J. Pharmacol., 31, 237, 1975.
- Borrell, J., Piva, F. y Martini, L.; en Hypothalamus and Endocrine Functions, Eds, Labrie, F., Meites, J. y Pelletier, G. Plenum Press, N.Y. p.37, 1976.
- Borrell, J., Piva, F., Motta, M., Leto, S. y Martini, L.; Adv. Biochem. Psychopharmacol., 16, 115, 1977.
- Bray, P.F., Ely, R.S., Kelly, V.C.; Arch. Neurol., 72, 583, 1954.
- Bray, P.F., Ely, R.S., Zapata, G. y Kelly, V.C., Neurology, 10, 842, 1960.

Callingham, B.A. y Cass, R.; en *Clinical Chemistry of Monoamines*.
Eds. Varley, H. y Gowenlock, A.H., Elsevier. Amsterdam. p. 19,
1963.

Cannon, W.B.; *Am.J.Physiol.*, 33, 356, 1914.

Carlsson, A., Falck, B. y Hillarp, N.Å.; *Acta Physiol.Scand.*,
56, Suppl.196, 1, 1962.

Corrodi, H., Fuxe, K. y Hökfelt, T.; *J.Pharm.Pharmacol.*, 18, 556,
1966.

Corrodi, H., Fuxe, K., Lidbrink, P. y Olson, L., *Brain Research*,
29, 1, 1971.

Costa, P.J., Glaser, G.H. y Bonnycastle, D.D., *Arch.Neurol.*,
74, 88, 1955.

Critchlow, V., Liebelt, R.A., Bar-Sela, M., Mountcastle, W. y
Lipscomb, H.S., *Am.J.Physiol.*, 205, 807, 1963.

Dallman, M.F. y Jones, M.T.; en *Brain-Pituitary-Adrenal*
Interrelationships. Eds. Brodish, A. y Redgate, E.S., S.Karger,
Basel, p.176, 1973.

Dallman, M.F. y Yates, F.E.; *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 156, 696, 1969.

Davis,W.M., Experientia, 18, 235, 1962.

Dill,R.E., Arch.Int.Pharmacodyn.Ther., 160, 363, 1966.

Dunn,J., Scheving,L. y Millet,P.; Am.J.Physiol. 223, 402, 1972.

Eisenberg,R.M.; Neuroendocrinology, 17, 154, 1975.

Elliot,P.N.C., Jenner,P., Chadwick,D., Reynolds,E. y Marsden, C.D., J.Pharm.Pharmac., 29, 41, 1977.

Engeland,W.C., Shinsako,J., Winget,C.M., Vernikos- Danellis, J. y Dallman,M.F.; Endocrinology 100, 138, 1977.

Fuxe,K., Corrodi,H., Hökfelt,T. y Jonsson,G.; Prog.Brain. Res., 32, 42, 1970.

Fuxe,K. y Hökfelt,T.; en Frontiers in Neuroendocrinology. Eds.Ganong,W.F. y Martini,L. Oxford University Press,N.Y. p.47, 1969.

Fuxe,K., Hökfelt,T., Jonsson,G., Levine,S., Lidbrink,P. y Löfström,A.; en Brain-Pituitary-Adrenal Interrelationships. Eds.Brodish,A. y Redgate,E.S. S.Karger,Basel, p.239, 1973.

Ganong,W.F.; en The Hypothalamus,Eds.Martini,L., Motta,M. y Fraschini,F., Academic Press, N.Y. p.313, 1970.

- Ganong, W.F. y Lorenzen, L.; en *Neuroendocrinology*. Eds. Martini, L. y Ganong, W.F. Academic Press, N.Y. vol.II. p.583. 1967.
- Gibbs, F.P.; *Am. J. Physiol.*, 219, 288, 1970.
- Gordon, R., Spector, S., Sjoerdsma, A. y Udenfriend, S.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 153, 440, 1966.
- Gupta, D., Breitmaier, G., Bierich, J.R., Voelter, W., Breitmaier, E., König, W. y Jung, G.; *J. Steroids Biochem.*, 5, 269, 1974.
- Hadfield, M.G.; *Arch. Neurol.*, 26, 78, 1972.
- Halberg, F., Albrecht, P.G. y Bittner, J.; *Am. J. Physiol.*, 197, 1083, 1959.
- Haus, E., Halberg, F., Kühl, J.F.W. y Lakatua, D.J.; en *Chronobiological Aspects of Endocrinology*. Eds. Aschoff, J., Ceresa, F. y Halberg, F. F.K. Schattauer Verlag, N.Y. p.169, 1974.
- Hedge, G.A. y Smelik, P.G.; *Science* 159, 891, 1968.
- Hiroshige, T.; en *Brain-Pituitary-Adrenal Interrelationships*. Eds. Brodish, A., Redgate, E.S., S. Karger, Basel, p.239, 1973.
- Jayle, M.F. y Crépy, O.; en *Analyse des Stéroïdes Hormonaux*. Ed. Masson. Paris. vol.I. p.61, 1961.

- Johnson, J.T. y Levine, S.; *Neuroendocrinology* 11, 268, 1973.
- Kitabchi, A.E., Solomon, S.S. y Williams, R.H.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 296, 1968.
- Kobayashi, R.M., Palkovits, M., Kizer, J.S., Jacobowitz, D.M. y Kopin, I.J.; en *Catecholamines and Stress*. Eds. Usdin, E. Kvetňanský, R. y Kopin, I.J. Pergamon Press, N.Y. p. 29, 1976.
- Krieger, D.T.; *J. Clin. Endocr. Met.*, 22, 490, 1962.
- Krieger, D.T.; en *Chronobiological Aspects of Endocrinology*. Eds. Aschoff, J., Ceresa, F. y Halberg, F. F.K. Schattauer Verlag. N.Y. p. 41, 1974.
- Krieger, D.T. y Krieger, H.P.; *J. Clin. Endocr. Met.*, 26, 929, 1966.
- Kvetňanský, R. y Mikulaj, L.; *Endocrinology* 87, 738, 1970.
- Lathi, R.A. y Barsuhn, C.; *Psychopharmacologia*, 35, 215, 1974.
- Lathi, R.A. y Barsuhn, C.; *Res. Com. Chem. Path. Pharmacol.*, 11, 595, 1975.
- Leppik, I.E. y Sherwin, A.L.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 200, 570, 1977.
- Lew, G.M.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 30, 1975.

- Lidbrink,P., Corrodi,H., Fuxe,K. y Olson,L.; Brain Research, 45, 507, 1972.
- Lindell,T.J., Ellinger,R., Warren,J.T., Sundheimer,D. y O'Malley,A.F.; Mol.Pharmacol., 13, 426, 1977.
- Lloréns,I., Borrell,J. y Borrell,S.; Hormone Res. 4, 321, 1973.
- Mäkelä,S., Näätänen,E. y Rinne,U.K.; Acta Endocr., 32, 1, 1959.
- Mangili,G., Motta,M. y Martini,L.; en Neuroendocrinology. Eds. Martini,L. y Ganong,W.F. Academic Press. N.Y. vol.I. p.297, 1966.
- Marks,B.H., Hall,M.M., y Bhattacharya,A.N.; Prog.Brain Res., 32, 57, 1970.
- Mason,J.W., Psychosom.Med., 30, 576, 1968.
- Matsumura,M., Kurosawa,A. y Ogawa,Y.; Steroids, 9, 537, 1967.
- Maynert,E.W.; Fed.Proc., 26, 1111, 1967.
- Maynert,E.W. y Levi,R.; J.Pharmacol.Exp.Ther., 143, 90, 1964.
- Moore,K.E. y Lariviere,E.W.; Biochem.Pharmacol., 13, 1098, 1964.

Morimoto,Y., Oishi,T., Arisue,K., Ogawa,Z., Tanaka,F., Yano,
S. y Yamamura,Y.; Acta Endocr., 80, 527, 1975.

Nagura,M.; Jap.J.Pharmacol., 22, 545, 1972.

Oppenheimer,J.H., Fisher,L.V. y Jailer,J.W.; J.Clin.Endocr.
Metab., 21, 1023, 1961.

Persson,T. y Waldeck,B.; J.Pharm.Pharmac., 23, 377, 1971.

Pincus,G.; Recent Progr.Hormone Res., 1, 123, 1947.

Pohorecky,L.A. y Wurtman,R.J.; Pharmacol.Rev., 23, 1, 1971.

Redgate,E.S.; Life Sci., 19, 137, 1976.

Reinberg,A. y Halberg,F.; Ann.Rev.Pharmacol., 11, 455, 1971.

Rerup,C. y Hedner,P.; Acta Endocr., 39, 518, 1962.

Retiene,K.; en The Hypothalamus. Eds. Martini,L., Motta,M.
y Fraschini,F. Academic Press. N.Y. p.551, 1970.

Rivas,C. y Borrell,S.; J.Endocr., 51, 283, 1971.

Roe,J.H.; en Methods of Biochemical Analysis. Ed. Glick,D.
Interscience Publishers,N.Y. 1, p.115, 1954.

Sayers,G. y Sayers,M.A.; Recent Progr.Hormone Res., 2, 81, 1948.

Scapagnini,U., Van Loon,G.R., Moberg,G.P. y Ganong,W.F.; Eur.J.Pharmacol., 11, 266, 1970.

Scapagnini,U., Van Loon,G.R., Moberg,G.P., Preziosi,P. y Ganong,W.F.; Neuroendocrinology, 10, 155, 1972.

Scheving,L.E., Harrison,W.H., Gordon,P. y Pauly,J.E.; Am.J. Physiol., 214, 166, 1968a.

Scheving,L.E., Harrison,W.H. y Pauly,J.E.; Am.J.Physiol., 215, 799, 1968b.

Selye,H.; Nature, 138, 32, 1936.

Shellenberger,M.K. y Gordon,J.H.V.;Anal.Biochem., 49, 356, 1971.

Shore,P.A. y Olin,J.S.; J.Pharmacol.Exp.Ther., 122, 295, 1958.

Silber,R.H. y Porter,C.C.; en Methods of Biochemical Analysis Ed.Glick,D. Interscience Publishers,N.Y. 4, p.139, 1957.

Simon,M.L. y George,R.; Neuroendocrinology, 17, 125, 1975.

Snedecor, G.W.; Statistical Methods, Ed. Ames. Iowa State University Press, 1956.

Snider, S.R. y Snider, R.S.; Arch. Neurol., 34, 162, 1977.

Thierry, A.M., Javoy, F., Glowinski, J. y Kety, S.S.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 163, 163, 1968.

Ulrich, R.S. y Yuwiler, A.; Endocrinology 92, 611, 1973.

Van Loon, G.R., Hilger, L., King, A.B., Boryczka, A.T. y Ganong, W.F. Endocrinology, 88, 1404, 1971a.

Van Loon, G.R., Scapagnini, V., Moberg, G.P. y Ganong, W.F. Endocrinology 89, 1464, 1971b.

Vernikos-Danellis, J.; Vitamins and Hormones 23, 97, 1965.

Vernikos-Danellis, J., Berger, P. y Barchas, J.D.; Prog. Brain Res., 39, 303, 1973.

Vogt, M., J. Physiol., 123, 451, 1954.

West, G.B.; Quant. Rev. Biol., 30, 116, 1955.

Wurtman, R.J. y Axelrod, J.; Science 150, 1464, 1965.

Wurtman, R.J. y Axelrod, J.; J. Biol. Chem., 241, 2301, 1966.

Yasuda,N., Takebe,K. y Greer,M.A.; Neuroendocrinology, 21,
214, 1976.

Zimmermann,E. y Critchlow,V.; Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 125,
658, 1967.

Zolovick,A.J. en The Neurobiology of the Amygdala Ed.
Eleftheriou,B.E. Plenum Press. N.Y. p.643. 1972.